

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2001 年 3 月 29 日 (29.03.2001)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 01/21792 A1

(51) 国際特許分類: C12N 15/12, 5/10, C07K
14/47, 16/18, C12P 21/02, C12Q 1/68

(21) 国際出願番号: PCT/JP00/06416

(22) 国際出願日: 2000 年 9 月 20 日 (20.09.2000)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願平 11/267835 1999 年 9 月 21 日 (21.09.1999) JP

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 株式会社
中外分子医学研究所 (CHUGAI RESEARCH INSTI-
TUTE FOR MOLECULAR MEDICINE, INC.) [JP/JP];
〒300-4101 茨城県新治郡新治村永井153番地2 Ibaraki
(JP).

(72) 発明者: および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 根津淳一 (NEZU,

Jun-ichi) [JP/JP]. 大瀬飛鳥 (OSE, Asuka) [JP/JP]; 〒
300-4101 茨城県新治郡新治村永井153番地2 株式会社
中外分子医学研究所内 Ibaraki (JP). 辻 彰 (TSUJI,
Akira) [JP/JP]; 〒920-0865 石川県金沢市長町1丁目3
番10号 Ishikawa (JP).

(74) 代理人: 清水初志, 外 (SHIMIZU, Hatsushi et al.); 〒
300-0847 茨城県土浦市卸町1-1-1 関鉄つくばビル6階
Ibaraki (JP).

(81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB,
BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM,
DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL,
IN, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV,
MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT,
RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA,
UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW,
MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), ユーラシア特許 (AM,
AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許
(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT,
LU, MC, NL, PT, SE), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI,
CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

[続葉有]

(54) Title: TRANSPORTER GENES OATP-B, C, D AND E

(54) 発明の名称: トランスポーター遺伝子 OATP-B, C, D, および E

(57) Abstract: Four novel transporter genes are successfully cloned by screening novel transporter genes on the basis of human OATP transporter gene sequence. These transporters are useful in developing drugs by taking advantage of the activity of transporting biological substances and various drugs. It is also found out that these transporter genes have single nucleotide polymorphisms (SNP). Gene diagnosis based on the polymorphisms (SNP, etc.) in these transporter genes makes it possible to judge, for example, the efficacy of a drug therapy.

(57) 要約:

ヒト OATP トランスポーターの遺伝子配列を基に新規なトランスポーター遺伝子のスクリーニングを行い、4つの新たなトランスポーターの遺伝子をクローニングすることに成功した。これらのトランスポーターは、生体物質や様々な薬物に対する輸送活性を利用したドラッグの開発に有用である。また、これらトランスポーター遺伝子には一塩基多型 (SNP) が存在していることを見出した。これらトランスポーター遺伝子の多型 (SNP 等) を基にした遺伝子診断により、例えば薬物治療の有効性を判断することが可能になる。



添付公開書類:
— 国際調査報告書

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

明細書

トランスポーター遺伝子OATP-B、C、D、およびE

技術分野

本発明は、細胞外から細胞内へ、あるいは細胞内から細胞外への物質の輸送に関与するトランスポーターファミリーに関する。

背景技術

栄養素や内因性物質の細胞内への取り込み機構において、生体膜に存在する多種の輸送担体（トランスポーター）の関与と、その輸送機構が最近明らかになりつつある(Tsuji, A. and Tamai, I., Pharm. Res., 13, 963-977, 1996.)。これらのトランスポーターには、輸送される物質の構造認識能が備わっており、物質を選択的に輸送するが、比較的その構造認識が広いトランスポーターの場合、本来は生体異物である医薬品などについても誤認識し、積極的に細胞内へ輸送してしまうと考えられる。基本的に薬物の生体膜透過は、その分子サイズ、脂溶性、水素結合能などの物理化学的特性に依存する単純拡散に従っており、特にイオン性薬物の場合には、非解離型分子のみが pH-分配仮説に従って生体膜を透過すると考えられていた。しかし、細胞内外の効率的な物質交換活性が必要な小腸、腎尿細管、胎盤、脳脈絡叢の上皮細胞や、肝実質細胞、血液脳関門などでは、多くの薬物は単純拡散以外の特異的機構、つまりトランスポーターによる能動的な輸送により細胞膜を透過することが明らかとなってきた(玉井郁巳、辻彰：ファルマシア、31、493-497、1995.、齋藤秀之、乾賢一：医学のあゆみ、179、393-397、1996.、玉井郁巳：薬物動態、11、642-650、1996.)。例えば、非エステル型の経口用 β -ラクタム抗生物質は生理的 pH においては両性または負に荷電し、脂溶性は極めて低いにも関わらず、腸管からの吸収は良好であることが知られている

。単離膜小胞系を用いた輸送研究により、これらの薬物の吸収過程には、刷子縁膜に局在する H^+ 駆動型ペプチドトランスポーターが関与していることが示されるようになった(Okano, T. et al., J. Biol. Chem. 261, 14130-14134, 1986.)。ペプチド輸送系は、ジあるいはトリペプチドを認識するが、テトラペプチド以上は認識できず、ペプチドサイズについては極めて厳密であるものの、非天然のアミノ酸からなるペプチドは認識するといった比較的広い基質認識性を持つ。 β -ラクタム抗生物質のペプチドトランスポーターによる輸送も、やはりこの広い基質認識性ゆえの誤認識による輸送であり、臨床的にはそれを図らずも利用していたことになる(Tsuiji, A., American Chemical Society (eds. Taylor, M. D., Amidon, G. L.), Washington, D. C., 101-134, 1995.)。さらには、脂溶性の高い脂肪酸のような物質の生体膜透過においても、トランスポーターが関与している可能性が報告されている(Schaffer, J. and Lodish, H., Cell, 79, 427-436, 1994.)。

ところで、様々なトランスポーターは各臓器、細胞が持つ生理的役割に応じて備わっているはずであり、その分布や機能には臓器特異性が期待される。従って、薬物動態に臓器選択性をもたらす手法としてトランスポーターを利用することが期待できる。すなわち、トランスポーターを利用した臓器特異的薬物デリバリー(DDS)が可能であると考えられる。また、脂溶性をあげることによる単純拡散に頼った薬物の吸収性改善は、肝臓における初回通過効果を増大させたり、臓器移行性を非特異的に増大させる可能性が高い。しかし、トランスポーターの基質特異性を利用したドラッグデザインを行うことにより、脂溶性とは無関係に薬物の吸収性を高めることも可能であると考えられる(林喜代美 他: Drug Delivery System, 11, 205-213, 1996.)。このような目的のためには、多くのトランスポーターを分子レベルで同定し、その性質についての詳細な解析を行うことが必須であるが、トランスポーターはその生化学的な取り扱いの難しさと、機能測定の

複雑さから、膜生理学的な研究の多さに比較し、分子レベルでの同定が非常に遅れている。

最近になり、外来遺伝子発現系であるアフリカツメガエル(*Xenopus*)卵母細胞を用いた発現クローニング法によりいくつかのトランスポーターの cDNA がクローニングされるようになり、構造上の類似性が存在することが明らかになってきた(Fei, Y. -J. et al., *Nature*, 368, 563-566, 1994.)。例えば、1994 年に Kopsell らによって、基底膜型と推定される有機カチオントランスポーター OCT1 が発現クローニング法によってクローニングされた(Grundemann, D. et al., *Nature*, 372, 549-552, 1994.)。その後、OCT1 の配列をもとにしたホモロジークローニングによって OCT2 が同定された(Okuda, M. et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 224, 500-507, 1996.)。OCT1 と OCT2 はお互いに 67% という非常に高い相同性を示す(Grundemann, D. et al., *J. Biol. Chem.* 272, 10408-10413, 1997.)。両者とも腎臓に強い発現が見られるが、OCT1 の場合はそれ以外にも肝臓、結腸、小腸に発現が存在するのに対し、OCT2 は腎臓に特異的であり、組織分布も異なっている。

また、別のトランスポーターとしては、ヒト OATP トランスポーター (以降、「OATP-A」と称する。*Gastroenterology* 109 (4), 1274-1282 (1995)) が知られている。このトランスポーターはナトリウムイオン非依存的に様々な内因物質や外来異物を輸送する能力を持つタンパクである。OATP-A によって輸送される物質にはブロモスルフォフタレイン (bromosulphophthalein)、胆汁酸、ステロイドホルモンなどがあることが知られている。また、プロスタグランジンを輸送する能力を持つ PGT も OATP-A に有意な相同性を示し、これらは遺伝子ファミリー (OATP ファミリー) を形成していると考えられる。

トランスポーターについての分子レベルでの同定については、これら報告例を含めわずかであり、いまだ臨床上有用な多くの未知のトランスポーターが存在していると考えられる。

発明の開示

本発明は、OATP ファミリーに属する新規なトランスポーター遺伝子および該遺伝子がコードするタンパク質、並びにそれらの用途を提供することを課題とする。

本発明者らは、新規トランスポーターをコードする遺伝子を見いだす目的で、ヒト OATP トランスポーター (Gastroenterology 109 (4), 1274-1282 (1995)) (以下 OATP-A とする) の配列をクエリーとし、アメリカ NCBI (National Center for Biotechnology Information, URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/index.html>) のヒト EST (Expressed Sequence Tag) データベース (URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/blast.cgi>) に対して tBLASTn サーチを試みた。その結果、ヒト OATP-A と有意な相同性を有するアミノ酸配列をコードし得る EST がいくつか見いだされた。次に、これらの EST の配列をクエリーとし再度データベースをサーチしたところ、既知であるヒト OATP-A 遺伝子、およびヒトプロスタグランジントランスポーター遺伝子 (J. Clin. Invest. 98 (5), 1142-1149 (1996)) (以下 PGT とする) 由来の EST であると明らかに判定されるもの以外はいずれも未知の遺伝子由来であることが明らかとなり、それらは未同定のトランスポーター遺伝子由来の EST であると考えられた。そこで、これらの EST の配列を用い、その全長 cDNA のクローニングを、PCR 法、およびブランクハイブリダイゼーション法による cDNA ライブラリーのスクリーニングにより試みた。その結果、4 つの新規なトランスポーター様タンパクをコードする遺伝子をクローニングすることに成功した。これらの遺伝子がコードするタンパクはいずれもヒト OATP-A に有意な相同性を示すことから、これらの遺伝子をそれぞれ OATP-B, C, D, および E と命名した。tBLASTn サーチで見いだされていた EST は、全てヒト OATP-A, B, C, D, E およびヒト PGT 遺伝子由来の EST であることが判明した。

上述のように、ヒト OATP-A はナトリウムイオン非依存的に様々な内因物質や外来異物を輸送する能力を持つトランスポータータンパク質であり、プロモスルフオフタレイン (bromosulfophthalein)、胆汁酸、ステロイドホルモンなどを輸送することが知られている。また、プロスタグランジンを輸送する能力を持つ PGT も OATP-A に有意な相同性を示す。これらのトランスポーター遺伝子は遺伝子ファミリー (OATP ファミリー) を形成していると考えられ、生体にとって不要な物質の除去や、様々な物質の生体内濃度の調節などに関与している可能性が推測されている (J Biol Chem. 1998 Aug 28;273(35):22395-401)。

本発明において見いだされた新規 OATP ファミリーメンバーにおいても同様に、生体にとって必要な物質や、あるいは不要な物質の生体内濃度を調節する機能を持つことが推測される。また、本発明者らは、OATP-C が医薬品である β ラクタム系の抗生物質を輸送する能力を持つことを明らかにした。このことから、本来は生体外異物である薬物も OATP ファミリータンパク質によって細胞内へ取り込まれたり、あるいは排出されている可能性が推測される。従って、OATP ファミリータンパク質の基質特異性などの輸送特性やその生体内分布を利用することにより、薬物動態を制御したり、より吸収性の高い薬物を迅速に設計、あるいはスクリーニングすることが可能であると考えられる。特に、RT-PCR 法による解析から、OATP-E は様々な固形癌細胞に高発現しているが、血球系細胞では極めて発現が少ないことが判明した。OATP-E 遺伝子を用いたスクリーニング系を構築し、これを用いたスクリーニングを行うことにより OATP-E により特異的に細胞内へ取り込まれる抗癌剤を得ることができれば、それは血球系細胞に対する障害が軽減された抗癌剤となり得ることが期待される。

また、OATP ファミリータンパク質が薬物の生体内動態の制御に関与しているとする、その遺伝的多型性により、薬物動態が変化することが予想される。既に、一塩基多型 (Single Nucleotide Polymorphism; SNP) などの遺伝子多型により、遺伝子の発現量や、コードされるアミノ酸配列に個人差が生じることが知

られている (Nat Genet. 1999 Jul;22(3):231-8; Nat Genet. 1999 Jul;22(3):239-47)。OATP ファミリー遺伝子における遺伝子多型により、輸送活性や基質特異性などの輸送特性に個人差が生じ、ひいては OATP ファミリーによって制御されている薬物などの生体内動態に個人差が生じることが予想される。このような個人差により、実際には、特定の薬物の有効性、反応性の差が生じることが推測される。よって、OATP ファミリー遺伝子における SNP などの多型を詳細に調べ、遺伝型と表現形質（薬物に対する反応性）との関連に関する情報が蓄積されたならば、遺伝型を遺伝診断により調べることによって、その個人の薬物に対する反応性を推測することが可能になると考えられる。

実際、本発明者らは、OATP ファミリー遺伝子のクローニング過程において、以下の 3 種のアミノ酸変化を伴う SNP を健常人中に見いだした。

OATP-B 遺伝子 486 番目のコドンにおける多型 (tct : Ser、あるいは ttt : Phe)

OATP-C 遺伝子 130 番目のコドンにおける多型 (aat : Asn、あるいは gat : Asp)

OATP-C 遺伝子 174 番目のコドンにおける多型 (gtg : Val、あるいは gcg : Ala)

これら以外にも OATP ファミリー遺伝子中に多型が存在し、表現形質と関連している可能性が推測される。

また、このような生体内における OATP ファミリータンパク質の重要な役割を鑑みると、その遺伝子変異による輸送機能の欠損に起因する疾患が存在することが推測される。実際、有機カチオントランスポーターの一つである OCTN2 トランスポーターにおいては、その遺伝子変異が全身性カルニチン欠乏症 (Systemic Carnitine Deficiency; SCD) の原因となっていることが明らかとなっており (Nat Genet. 1999 Jan;21(1):91-4)、トランスポーター遺伝子の変異に起因する遺伝性疾患が実際に存在することがわかっている。このようなトランスポーター遺伝子の変異に起因する遺伝性疾患については、その原因となるトランスポーター遺伝子を直接調べる遺伝子診断が臨床上非常に重要である。

本発明により明らかとなった OATP ファミリー遺伝子の構造を利用して、以上のような OATP ファミリー遺伝子の多型や変異を検出する遺伝子診断を行うことが可能となった。具体的には、OATP ファミリー遺伝子そのものを利用すること、あるいはその塩基配列から作製される合成オリゴヌクレオチドを PCR のプライマーなどとして利用することにより遺伝子診断を実施することが可能である。また、最近では DNA チップ技術、あるいは DNA アレイ技術と呼ばれる技術 (Nat Genet. 1999 volume 21 Supplement pp 1 - 60; Science 1999 Jan 1;283(5398):83-7) により、遺伝子の構造や発現量をより簡便に検出することが可能になっている。これらの方法も、OATP ファミリー遺伝子そのものを用いること、あるいはその塩基配列から作製される合成オリゴヌクレオチドを用いることにより実施することが可能である。

本発明は、新規なトランスポーターOATP-B、C、D、および E、およびその遺伝子、並びにそれらの用途に関し、より具体的には、

1. トランスポーター活性を有するタンパク質をコードする下記 (a) から (d) のいずれかに記載の DNA、
 - (a) 配列番号：2、4、6、または8に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質をコードする DNA。
 - (b) 配列番号：1、3、5、または7に記載の塩基配列のコード領域を含む DNA。
 - (c) 配列番号：2、4、6、または8に記載のアミノ酸配列において1若しくは複数のアミノ酸が置換、欠失、挿入、および/または付加したアミノ酸配列からなるタンパク質をコードする DNA。
 - (d) 配列番号：1、3、5、または7に記載の塩基配列からなる DNA とハイブリダイズする DNA。
2. 配列番号：2、4、6、または8に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質の部分ペプチドをコードする DNA、

3. (1) または (2) に記載の DNA が挿入されたベクター、
4. (1) 若しくは (2) に記載の DNA または (3) に記載のベクターを保持する形質転換細胞、
5. (1) または (2) に記載の DNA によりコードされるタンパク質またはペプチド、
6. (4) に記載の形質転換細胞を培養し、該細胞またはその培養上清から発現させたタンパク質を回収する工程を含む、(5) に記載のタンパク質またはペプチドの製造方法、
7. (5) に記載のタンパク質に結合する抗体、
8. 配列番号：1、3、5、または7に記載の塩基配列からなる DNA またはその相補鎖に相補的な少なくとも 15 ヌクレオチドを含むポリヌクレオチド、
9. (5) に記載のタンパク質により細胞外から細胞内へ輸送される化合物をスクリーニングする方法であって、
 - (a) (5) に記載のタンパク質を細胞膜上に発現する細胞を提供する工程、
 - (b) 該細胞に対し、標識された被検化合物を接触させる工程、
 - (c) 該細胞内に取り込まれた、標識された被検化合物を検出する工程、および
 - (d) 該細胞内に取り込まれる化合物を選択する工程、を含む方法、
10. (5) に記載のタンパク質のトランスポーター活性を促進または阻害する化合物をスクリーニングする方法であって、
 - (a) (5) に記載のタンパク質を細胞膜上に発現する細胞を提供する工程、
 - (b) 該細胞に対し、被検化合物および (5) に記載のタンパク質により輸送される標識された有機化合物を接触させる工程、
 - (c) 該細胞内に取り込まれた、標識された有機化合物の量を測定する工程、および

(d) 被検化合物非存在下において測定した場合（対照）と比較して、該細胞内に取り込まれる標識された有機化合物の量を増加または減少させる化合物を選択する工程、を含む方法、を提供するものである。

本発明者等により単離された新規なヒトトランスポーター「OATP-B」、「OATP-C」、「OATP-D」、および「OATP-E」cDNAの塩基配列をそれぞれ配列番号：1、3、5、および7に、また、該cDNAがコードするタンパク質のアミノ酸配列をそれぞれ配列番号：2、4、6、および8に示す。これらタンパク質は、ともにヒトOATP-Aトランスポーターと構造上の類似性を有しており、互いにファミリー（「OATP」ファミリー）を形成していると考えられる。

本発明のトランスポーターは、生体にとって必要な物質や不要な物質の生体内濃度を調節する機能を持つことが推測される。また、様々な薬物もOATPファミリータンパク質によって細胞内へ取り込まれたり、あるいは排出されている可能性が推測される。従って、OATPファミリータンパク質を利用して薬物動態を制御したり、より吸収性の高い薬物を迅速に設計、あるいはスクリーニングすることが可能であると考えられる。

本発明のトランスポータータンパク質には、上記ヒトトランスポーター「OATP-B」、「OATP-C」、「OATP-D」、および「OATP-E」タンパク質の変異体が含まれる。「変異体」とは、配列番号：2、4、6、または8に記載の天然型の「OATP-B」、「OATP-C」、「OATP-D」、または「OATP-E」タンパク質のアミノ酸配列においてアミノ酸が置換、欠失、付加、挿入などにより変異したアミノ酸配列を有するが、トランスポーター活性を有しているタンパク質を指す。タンパク質のアミノ酸の変異は人工的に行われたものでも、自然界において生じたものでもよい。

本発明において「トランスポーター活性を有する」とは、タンパク質が有機化合物を輸送する活性を有していることを指す。有機化合物としては、例えば、エストラジオール-17 β -グルクロナイド、エストロン-3-スルフェート、ベンジルベ

ニシリン、プロスタグランジン E2 などが挙げられるが、これらに制限されない。

また、「輸送する活性」には、細胞外から細胞内へ有機化合物を輸送する活性のみならず、細胞内から細胞外へ有機化合物を輸送する活性をも含む意である。本発明のトランスポータータンパク質には、これら活性の双方を有するものおよびいずれか一方を有するものが含まれる。タンパク質の有機化合物を輸送する活性は、例えば、標識した有機化合物を細胞に添加して、その取りこみまたは排出を検出することにより測定することができる。例えば、実施例記載の方法により検出することが可能である。

本発明者らは、OATP ファミリー遺伝子のクローニング過程において、以下の 3 種のアミノ酸変化を伴う SNP を健常人中に見いだした。

OATP-B 遺伝子 486 番目のコドンにおける多型 (tct : Ser、あるいは ttt : Phe)

OATP-C 遺伝子 130 番目のコドンにおける多型 (aat : Asn、あるいは gat : Asp)

OATP-C 遺伝子 174 番目のコドンにおける多型 (gtg : Val、あるいは gcg : Ala)

本発明のトランスポーターには、上記の変異を有するタンパク質、すなわち、配列番号：2 の 486 位のアミノ酸が Phe に置換されたアミノ酸配列からなるタンパク質、配列番号：4 の 130 位のアミノ酸が Asp に置換されたアミノ酸配列からなるタンパク質、および配列番号：4 の 174 位のアミノ酸が Ala に置換されたアミノ酸配列からなるタンパク質が含まれる。

「OATP-B」、「OATP-C」、「OATP-D」、および「OATP-E」には、上記以外にも多型が存在していると考えられ、本発明には、これら「OATP-B」、「OATP-C」、「OATP-D」、および「OATP-E」の多型が含まれる。これらの多型は、トランスポーターの発現量または活性に影響を及ぼし、その表現形質と関連している可能性が推測される。、OATP ファミリー遺伝子とその表現形質との関係がさらに明らかとなれば、OATP ファミリー遺伝子の多型や変異を検出することにより遺伝子診断を行うことが可能となると考えられる。

人為的にアミノ酸を改変する場合、当業者に公知のアミノ酸を改変する方法としては、例えば、PCR による部位特異的変異誘発システム (GIBCO-BRL, Gaithersburg, Maryland)、オリゴヌクレオチドによる部位特異的変異誘発法 (Kramer, W. and Fritz, HJ (1987) *Methods in Enzymol.*, 154:350-367)、Kunkel 法 (*Methods in Enzymol.* 85, 2763-2766 (1988)) などが挙げられる。アミノ酸の変異数および変異部位は本発明のタンパク質のトランスポーター活性が保持される限り特に制限はない。変異数は、置換であれば、通常、10 アミノ酸以内であり、好ましくは 6 アミノ酸以内であり、さらに好ましくは 3 アミノ酸以内であると考えられる。

変異するアミノ酸残基においては、アミノ酸側鎖の性質が保存されている別のアミノ酸に変異されることが望ましい。例えばアミノ酸側鎖の性質としては、疎水性アミノ酸 (A, I, L, M, F, P, W, Y, V)、親水性アミノ酸 (R, D, N, C, E, Q, G, H, K, S, T)、脂肪族側鎖を有するアミノ酸 (G, A, V, L, I, P)、水酸基含有側鎖を有するアミノ酸 (S, T, Y)、硫黄原子含有側鎖を有するアミノ酸 (C, M)、カルボン酸及びアミド含有側鎖を有するアミノ酸 (D, N, E, Q)、塩基含有側鎖を有するアミノ酸 (R, K, H)、芳香族含有側鎖を有するアミノ酸 (H, F, Y, W) を挙げることができる (括弧内はいずれもアミノ酸の一文字表記を表す)。

あるアミノ酸配列に対する 1 又は複数個のアミノ酸残基の欠失、付加及び／又は他のアミノ酸による置換により修飾されたアミノ酸配列を有するタンパク質がその生物学的活性を維持することはすでに知られている (Mark, D. F. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1984) 81, 5662-5666、Zoller, M. J. & Smith, M. *Nucleic Acids Research* (1982) 10, 6487-6500、Wang, A. et al., *Science* 224, 1431-1433、Dalbadie-McFarland, G. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1982) 79, 6409-6413)。

ヒト「OATP-B」、「OATP-C」、「OATP-D」、または「OATP-E」タンパク質のアミノ酸配列 (配列番号: 2、4、6、または 8) に複数個のアミノ酸残基が付加

されたタンパク質には、ヒト「OATP-B」、「OATP-C」、「OATP-D」、または「OATP-E」タンパク質を含む融合タンパク質が含まれる。融合タンパク質は、ヒト「OATP-B」、「OATP-C」、「OATP-D」、または「OATP-E」タンパク質と他のペプチド又はタンパク質とが融合したものであり、本発明に含まれる。融合タンパク質を作製する方法は、本発明のヒト「OATP-B」、「OATP-C」、「OATP-D」、または「OATP-E」タンパク質をコードする DNA と他のペプチド又はタンパク質をコードする DNA をフレームが一致するように連結してこれを発現ベクターに導入し、宿主で発現させればよく、当業者に公知の手法を用いることができる。本発明のタンパク質との融合に付される他のペプチド又はタンパク質としては、特に限定されない。

本発明のタンパク質との融合に付される他のペプチドとしては、例えば、FLAG (Hopp, T. P. et al., BioTechnology (1988) 6, 1204-1210)、6 個の His (ヒスチジン) 残基からなる 6×His、10×His、インフルエンザ凝集素 (HA)、ヒト c-myc の断片、VSV-GP の断片、p18HIV の断片、T7-tag、HSV-tag、E-tag、SV40T 抗原の断片、lck tag、 α -tubulin の断片、B-tag、Protein C の断片等の公知のペプチドを使用することができる。また、本発明のタンパク質との融合に付される他のタンパク質としては、例えば、GST (グルタチオン-S-トランスフェラーゼ)、HA (インフルエンザ凝集素)、イムノグロブリン定常領域、 β -ガラクトシダーゼ、MBP (マルトース結合タンパク質) 等が挙げられる。

市販されているこれらペプチドまたはタンパク質をコードする DNA を本発明のタンパク質をコードする DNA と融合させ、これにより調製された融合 DNA を発現させることにより、融合タンパク質を調製することができる。

また、本発明のトランスポータータンパク質には、上記ヒト「OATP-B」、「OATP-C」、「OATP-D」、または「OATP-E」タンパク質と構造上高い相同性を有し、トランスポーター活性を有するタンパク質が含まれる。このようなタンパク質としては、例えば、ヒト「OATP-B」、「OATP-C」、「OATP-D」、または「OATP-E」

タンパク質に対応する他の哺乳動物由来のタンパク質が含まれる。ヒト「OATP-B」、「OATP-C」、「OATP-D」、または「OATP-E」タンパク質と構造上高い相同性を有するタンパク質を単離するための方法としては、例えば、ハイブリダイゼーション技術 (Sambrook, J et al., Molecular Cloning 2nd ed. 9.47-9.58, Cold Spring Harbor Lab. press, 1989) が挙げられる。即ち、上記ヒト「OATP-B」、「OATP-C」、「OATP-D」、または「OATP-E」タンパク質をコードする DNA 配列 (配列番号: 1、3、5、もしくは 7) またはその一部を基に、これと相同性の高い他の哺乳動物由来の DNA を、DNA 同士の親和性を利用して単離し、単離した DNA から目的のタンパク質を調製することができる。DNA の単離に用いる他の生物としては、例えば、サル、マウス、ラット、ウサギ、ウシ、ブタ、イヌ、ネコなどが挙げられるが、これらに制限されない。このような DNA を単離するためのハイブリダイゼーションの条件 (ストリンジントな条件) の例を示せば、以下の如くである。即ち、「ExpressHyb Hybridization Solution」(CLONTECH 社製) を用い、55°C で 30 分以上プレハイブリダイゼーションを行った後、標識したプローブを添加し、37°C から 55°C で 1 時間以上保温することによりハイブリダイゼーションを行う。その後、2xSSC、0.1% SDS 中、室温で 20 分の洗浄を 3 回、次いで、1xSSC、0.1% SDS 中、37°C で 20 分の洗浄を 1 回行う。

より好ましい条件 (よりストリンジントな条件) としては、「ExpressHyb Hybridization Solution」(CLONTECH 社製) を用い、60°C で 30 分以上プレハイブリダイゼーションを行った後、標識したプローブを添加し、60°C で 1 時間以上保温することによりハイブリダイゼーションを行う。その後、2xSSC、0.1% SDS 中、室温で 20 分の洗浄を 3 回、次いで、1xSSC、0.1% SDS 中、50°C で 20 分の洗浄を 2 回行う。

さらに好ましい条件 (さらにストリンジントな条件) としては、「ExpressHyb Hybridization Solution」(CLONTECH 社製) を用い、68°C で 30 分以上プレハイブリダイゼーションを行った後、標識したプローブを添加し、68°C で 1 時間以

上保温することによりハイブリダイゼーションを行う。その後、2xSSC、0.1% SDS 中、室温で20分の洗浄を3回、次いで、0.1xSSC、0.1% SDS 中、50℃で20分の洗浄を2回行う。但し、ハイブリダイゼーションのストリンジェンシーに影響する要素としては温度や塩濃度など複数の要素が考えられ、当業者であればこれら要素を適宜選択することで同様のストリンジェンシーを実現することが可能である。

また、当業者であれば、ハイブリダイゼーション技術以外にも、例えば、ポリメラーゼ連鎖反応を利用した技術により、同様に、ヒト「OATP-B」、「OATP-C」、「OATP-D」、または「OATP-E」遺伝子と高い相同性を有する遺伝子を単離し、該遺伝子から目的のタンパク質を得ることが可能である。

このようなハイブリダイゼーション技術やポリメラーゼ連鎖反応技術を利用して単離されるタンパク質は、ヒト「OATP-B」、「OATP-C」、「OATP-D」、または「OATP-E」タンパク質と高い相同性を有すると考えられる。高い相同性は、アミノ酸レベルにおいて、少なくとも80%以上、好ましくは90%以上、さらに好ましくは95%以上の相同性である。配列の相同性を決定するには、文献 (Wilbur, W. J. and Lipman, D. J. Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1983) 80, 726-730) に記載のアルゴリズムにしたがえばよい。

本発明のタンパク質は、後述するそれを産生する細胞や宿主あるいは精製方法により、アミノ酸配列、分子量、等電点又は糖鎖の有無や形態などが異なり得る。しかしながら、得られたタンパク質がトランスポーター活性を有している限り、本発明に含まれる。

本発明のタンパク質は、当業者に公知の方法により、組み換えタンパク質として、また天然のタンパク質として調製することが可能である。組み換えタンパク質であれば、本発明のタンパク質をコードする DNA(例えば配列番号：1、3、5、または7に記載の塩基配列を有する DNA)を、適当な発現ベクターに組み込み、これを適当な宿主細胞に導入して得た形質転換体を回収し、抽出物を得た後

、イオン交換、逆相、ゲル濾過などのクロマトグラフィー、あるいは本発明のタンパク質に対する抗体をカラムに固定したアフィニティークロマトグラフィーにかけることにより、または、さらにこれらのカラムを複数組み合わせることにより精製し、調製することが可能である。

また、本発明のタンパク質をグルタチオン S トランスフェラーゼタンパク質との融合タンパク質として、あるいはヒスチジンを複数付加させた組み換えタンパク質として宿主細胞（例えば、動物細胞や大腸菌など）内で発現させた場合には、発現させた組み換えタンパク質はグルタチオンカラムあるいはニッケルカラムを用いて精製することができる。

融合タンパク質の精製後、必要に応じて融合タンパク質のうち目的のタンパク質以外の領域を、トロンピンまたはファクターXa などにより切断し、除去することも可能である。

天然のタンパク質であれば、当業者に周知の方法、例えば、本発明のタンパク質を発現している組織や細胞の抽出物に対し、後述する本発明のタンパク質に結合する抗体が結合したアフィニティークラムを作用させて精製することにより単離することができる。抗体はポリクローナル抗体であってもモノクローナル抗体であってもよい。

本発明は、また、本発明のタンパク質の部分ペプチドを包含する。本発明のタンパク質に特異的なアミノ酸配列からなる部分ペプチドは、少なくとも7アミノ酸、好ましくは8アミノ酸以上、さらに好ましくは9アミノ酸以上のアミノ酸配列からなる。該部分ペプチドは、例えば、本発明のタンパク質に対する抗体の作製、本発明のタンパク質に結合する化合物のスクリーニングや、本発明のタンパク質の促進剤や阻害剤のスクリーニングに利用し得る。本発明のタンパク質の部分ペプチドとしては、例えば、配列番号：2、4、6、または8に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質の機能ドメインからなる部分ペプチドなどが挙げられる。また、疎水性プロット解析から推定される疎水性領域や親水性領域の1つ

あるいは複数の領域を含む部分ペプチドが挙げられる。これらの部分ペプチドは1つの疎水性領域の一部あるいは全部を含んでいてもよいし、1つの親水性領域の一部あるいは全部を含んでいてもよい。

本発明の部分ペプチドは、遺伝子工学的手法、公知のペプチド合成法、あるいは本発明のタンパク質を適切なペプチダーゼで切断することによって製造することができる。ペプチドの合成は、例えば、固相合成法、液相合成法のいずれによってもよい。

本発明のタンパク質をコードする DNA は、上述したような本発明のタンパク質の *in vivo* や *in vitro* における生産に利用される他、例えば、本発明のタンパク質をコードする遺伝子の異常に起因する疾患や本発明のタンパク質により治療可能な疾患の遺伝子治療などへの応用も考えられる。本発明の DNA は、本発明のタンパク質をコードしうるものであればいかなる形態でもよい。即ち、mRNA から合成された cDNA であるか、ゲノム DNA であるか、化学合成 DNA であるかなどを問わない。また、本発明のタンパク質をコードしうる限り、遺伝暗号の縮重に基づく任意の塩基配列を有する DNA が含まれる。

本発明の DNA は、当業者に公知の方法により調製することができる。例えば、本発明のタンパク質を発現している細胞より cDNA ライブラリーを作製し、本発明の DNA の配列（例えば、配列番号：1、3、5、または7）の一部をプローブにしてハイブリダイゼーションを行うことにより調製できる。cDNA ライブラリーは、例えば Sambrook, J. et al., Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)に記載の方法により調製してもよいし、市販の DNA ライブラリーを用いてもよい。また、本発明のタンパク質を発現している細胞より RNA を調製し、逆転写酵素によって cDNA にした後、本発明の DNA の配列（例えば、配列番号：1、3、5、または7）に基づいてオリゴ DNA を合成し、これをプライマーとして用いて PCR 反応を行い、本発明のタンパク質をコードする cDNA を増幅させることにより調製することも可能である。

また、得られた cDNA の塩基配列を決定することにより、それがコードする翻訳領域を決定でき、本発明のタンパク質のアミノ酸配列を得ることができる。また、得られた cDNA をプローブとしてゲノム DNA ライブラリーをスクリーニングすることにより、ゲノム DNA を単離することができる。

具体的には、次のようにすればよい。まず、本発明のタンパク質を発現する細胞、組織、臓器から、mRNA を単離する。mRNA の単離は、公知の方法、例えば、グアニジン超遠心法(Chirgwin, J. M. et al., *Biochemistry* (1979) 18, 5294-5299)、AGPC 法 (Chomczynski, P. and Sacchi, N., *Anal. Biochem.* (1987) 162, 156-159) 等により全 RNA を調製し、mRNA Purification Kit (Pharmacia) 等を使用して全 RNA から mRNA を精製する。また、QuickPrep mRNA Purification Kit (Pharmacia) を用いることにより mRNA を直接調製することもできる。

得られた mRNA から逆転写酵素を用いて cDNA を合成する。cDNA の合成は、AMV Reverse Transcriptase First-strand cDNA Synthesis Kit (生化学工業) 等を用いて行うこともできる。また、本明細書に記載されたプライマー等を用いて、5'-Ampli FINDER RACE Kit (Clontech 製) およびポリメラーゼ連鎖反応 (polymerase chain reaction; PCR) を用いた 5'-RACE 法(Frohman, M. A. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* (1988) 85, 8998-9002; Belyavsky, A. et al., *Nucleic Acids Res.* (1989) 17, 2919-2932) にしたがって、cDNA の合成および増幅を行うことができる。

得られた PCR 産物から目的とする DNA 断片を調製し、ベクターDNA と連結する。さらに、これより組換えベクターを作製し、大腸菌等に導入してコロニーを選択して所望の組換えベクターを調製する。目的とする DNA の塩基配列は、公知の方法、例えば、ジデオキシヌクレオチドチェーンターミネーション法により確認することができる。

また、本発明の DNA においては、発現に使用する宿主のコドン使用頻度を考慮して、より発現効率の高い塩基配列を設計することができる (Grantham, R. et

al., Nucelic Acids Research (1981) 9, r43-74)。また、本発明の DNA は、市販のキットや公知の方法によって改変することができる。改変としては、例えば、制限酵素による消化、合成オリゴヌクレオチドや適当な DNA フラグメントの挿入、リンカーの付加、開始コドン (ATG) 及び／又は終止コドン (TAA、TGA、又は TAG) の挿入等が挙げられる。

本発明の DNA は、具体的には、配列番号：1 の塩基配列において 179 位の塩基 A から 2305 位の塩基 G からなる DNA、配列番号：3 の塩基配列において 100 位の塩基 A から 2172 位の塩基 T からなる DNA、配列番号：5 の塩基配列において 1 位の塩基 A から 2130 位の塩基 A からなる DNA、および配列番号：7 の塩基配列において 92 位の塩基 A から 2257 位の塩基 C からなる DNA を包含する。

また、本発明の DNA は、配列番号：1 の 179 位の塩基 A から 2305 位の塩基 G の塩基配列において 1635 位の C が T に置換された塩基配列からなる DNA、配列番号：3 の 100 位の塩基 A から 2172 位の塩基 T の塩基配列において 487 位の A が G に置換された塩基配列からなる DNA、配列番号：3 の 100 位の塩基 A から 2172 位の塩基 T の塩基配列において 620 位の T が C に置換された塩基配列からなる DNA を包含する。

本発明の DNA はまた、配列番号：1、3、5、または 7 に示す塩基配列からなる DNA とハイブリダイズする DNA であり、トランスポーター活性を有するタンパク質をコードする DNA を含む。ハイブリダイゼーションの条件としては、上記の条件が挙げられる。ハイブリダイズする DNA は、好ましくは天然由来の DNA、例えば cDNA 又は染色体 DNA である。

本発明は、また、本発明の DNA が挿入されたベクターを提供する。本発明のベクターとしては、宿主細胞内において本発明の DNA を保持したり、本発明のタンパク質を発現させるために有用である。

ベクターとしては、例えば、大腸菌を宿主とする場合には、ベクターを大腸菌 (例えば、JM109、DH5 α 、HB101、XL1Blue) などで大量に増幅させ大量調製する

ために、大腸菌で増幅されるための「ori」をもち、さらに形質転換された大腸菌の選抜遺伝子（例えば、なんらかの薬剤（アンピシリンやテトラサイクリン、カナマイシン、クロラムフェニコール）により判別できるような薬剤耐性遺伝子）を有すれば特に制限はない。ベクターの例としては、M13系ベクター、pUC系ベクター、pBR322、pBluescript、pCR-Scriptなどが挙げられる。また、cDNAのサブクローニング、切り出しを目的とした場合、上記ベクターの他に、例えば、pGEM-T、pDIRECT、pT7などが挙げられる。本発明のタンパク質を生産する目的においてベクターを使用する場合には、特に、発現ベクターが有用である。発現ベクターとしては、例えば、大腸菌での発現を目的とした場合は、ベクターが大腸菌で増幅されるような上記特徴を持つほかに、宿主をJM109、DH5 α 、HB101、XL1-Blueなどの大腸菌とした場合においては、大腸菌で効率よく発現できるようなプロモーター、例えば、lacZプロモーター（Wardら、Nature（1989）341, 544-546；FASEB J.（1992）6, 2422-2427）、araBプロモーター（Betterら、Science（1988）240, 1041-1043）、またはT7プロモーターなどを持っていることが不可欠である。このようなベクターとしては、上記ベクターの他にpGEX-5X-1（Pharmacia社製）、「QIAexpress system」（Qiagen社製）、pEGFP、またはpET（この場合、宿主はT7 RNAポリメラーゼを発現しているBL21が好ましい）などが挙げられる。

また、ベクターには、ポリペプチド分泌のためのシグナル配列が含まれていてもよい。タンパク質分泌のためのシグナル配列としては、大腸菌のペリプラズムに産生させる場合、pelBシグナル配列（Lei, S. P. et al J. Bacteriol.（1987）169, 4379）を使用すればよい。宿主細胞へのベクターの導入は、例えば塩化カルシウム法、エレクトロポレーション法を用いて行うことができる。

大腸菌以外にも、例えば、本発明のタンパク質を製造するためのベクターとしては、哺乳動物由来の発現ベクター（例えば、pcDNA3（Invitrogen社製）や、pEGF-BOS（Nucleic Acids. Res.1990, 18(17),p5322）、pEF、pCDM8）、昆虫細胞

由来の発現ベクター（例えば「Bac-to-BAC baculovirus expression system」（GIBCO BRL 社製）、pBacPAK8）、植物由来の発現ベクター（例えば pMH1、pMH2）、動物ウィルス由来の発現ベクター（例えば、pHSV、pMV、pAdexLcw）、レトロウィルス由来の発現ベクター（例えば、pZIPneo）、酵母由来の発現ベクター（例えば、「Pichia Expression Kit」（In vitrogen 社製）、pNV11、SP-Q01）、枯草菌由来の発現ベクター（例えば、pPL608、pKTH50）が挙げられる。

CHO 細胞、COS 細胞、NIH3T3 細胞等の動物細胞での発現を目的とした場合には、細胞内で発現させるために必要なプロモーター、例えば SV40 プロモーター（Mulligan ら、Nature (1979) 277, 108）、MMLV-LTR プロモーター、EF1 α プロモーター（Mizushima ら、Nucleic Acids Res. (1990) 18, 5322）、CMV プロモーターなどを持っていることが不可欠であり、細胞への形質転換を選抜するための遺伝子（例えば、薬剤（ネオマイシン、G418 など）により判別できるような薬剤耐性遺伝子）を有すればさらに好ましい。このような特性を有するベクターとしては、例えば、pMAM、pDR2、pBK-RSV、pBK-CMV、pOPRSV、pOP13 などが挙げられる。

さらに、遺伝子を安定的に発現させ、かつ、細胞内での遺伝子のコピー数の増幅を目的とする場合には、核酸合成経路を欠損した CHO 細胞にそれを相補する DHFR 遺伝子を有するベクター（例えば、pCHO1 など）を導入し、メトトレキサート（MTX）により増幅させる方法が挙げられ、また、遺伝子の一過性の発現を目的とする場合には、SV40 T 抗原を発現する遺伝子を染色体上に持つ COS 細胞を用いて SV40 の複製起点を持つベクター（pcD など）で形質転換する方法が挙げられる。複製開始点としては、また、ポリオーマウィルス、アデノウィルス、ウシバビローマウィルス（BPV）等の由来のものを用いることもできる。さらに、宿主細胞系で遺伝子コピー数増幅のため、発現ベクターは選択マーカーとして、アミノグリコシドトランスフェラーゼ（APH）遺伝子、チミジンキナーゼ（TK）

遺伝子、大腸菌キサンチングアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ (Ecogpt) 遺伝子、ジヒドロ葉酸還元酵素 (dhfr) 遺伝子等を含むことができる。

一方、動物の生体内で本発明の DNA を発現させる方法としては、本発明の DNA を適当なベクターに組み込み、例えば、レトロウィルス法、リボソーム法、カチオニックリボソーム法、アデノウィルス法などにより生体内に導入する方法などが挙げられる。これにより、本発明のトランスポーター遺伝子の変異に起因する疾患に対する遺伝子治療を行うことが可能である。用いられるベクターとしては、例えば、アデノウィルスベクター (例えば pAdexlcw) やレトロウィルスベクター (例えば pZIPneo) などが挙げられるが、これらに制限されない。ベクターへの本発明の DNA の挿入などの一般的な遺伝子操作は、常法に従って行うことが可能である (Molecular Cloning, 5.61-5.63)。生体内への投与は、ex vivo 法であっても、in vivo 法であってもよい。

また、本発明は、本発明の DNA または本発明のベクターが導入された形質転換細胞を提供する。本発明のベクターが導入される宿主細胞としては特に制限はなく、例えば、大腸菌や種々の動物細胞などを用いることが可能である。本発明の形質転換細胞は、例えば、本発明のタンパク質の製造や発現のための産生系として使用することができる。タンパク質製造のための産生系は、in vitro および in vivo の産生系がある。in vitro の産生系としては、真核細胞を使用する産生系や原核細胞を使用する産生系が挙げられる。

真核細胞を使用する場合、例えば、動物細胞、植物細胞、真菌細胞を宿主に用いることができる。動物細胞としては、哺乳類細胞、例えば、CHO (J. Exp. Med. (1995) 108, 945)、COS、3T3、ミエローマ、BHK (baby hamster kidney)、HeLa、Vero、両生類細胞、例えばアフリカツメガエル卵母細胞 (Valle, et al., Nature (1981) 291, 358-340)、あるいは昆虫細胞、例えば、Sf9、Sf21、Tn5 が知られている。CHO 細胞としては、特に、DHFR 遺伝子を欠損した CHO 細胞である dhfr-CHO (Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1980) 77, 4216-4220) や CHO K-1

(Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1968) 60, 1275) を好適に使用することができる。動物細胞において、大量発現を目的とする場合には特に CHO 細胞が好ましい。宿主細胞へのベクターの導入は、例えば、リン酸カルシウム法、DEAE デキストラン法、カチオニックリボソーム DOTAP (ペーリンガー・マンハイム社製) を用いた方法、エレクトロポレーション法、リボフェクションなどの方法で行うことが可能である。得られた形質転換体からの組換えタンパク質の精製は、常法、例えば、文献「The Qiaexpressionist handbook, Qiagen, Hilden, Germany」記載の方法を用いて行うことが可能である。

植物細胞としては、例えば、ニコチアナ・タバカム (*Nicotiana tabacum*) 由来の細胞がタンパク質生産系として知られており、これをカルス培養すればよい。真菌細胞としては、酵母、例えば、サッカロミセス (*Saccharomyces*) 属、例えば、サッカロミセス・セレビスエ (*Saccharomyces cerevisiae*)、糸状菌、例えば、アスペルギルス (*Aspergillus*) 属、例えば、アスペルギルス・ニガー (*Aspergillus niger*) が知られている。

原核細胞を使用する場合、細菌細胞を用いる産生系がある。細菌細胞としては、大腸菌 (*E. coli*)、例えば、JM109、DH5 α 、HB101 等が挙げられ、その他、枯草菌が知られている。

これらの細胞を目的とする DNA により形質転換し、形質転換された細胞を *in vitro* で培養することによりタンパク質が得られる。培養は、公知の方法に従い行うことができる。例えば、動物細胞の培養液として、例えば、DMEM、MEM、RPMI 1640、IMDM を使用することができる。その際、牛胎児血清 (FCS) 等の血清補液を併用することもできるし、無血清培養してもよい。培養時の pH は、約 6~8 であるのが好ましい。培養は、通常、約 30~40°C で約 15~200 時間行い、必要に応じて培地の交換、通気、攪拌を加える。

一方、*in vivo* でタンパク質を産生させる系としては、例えば、動物を使用する産生系や植物を使用する産生系が挙げられる。これらの動物又は植物に目的と

する DNA を導入し、動物又は植物の体内でタンパク質を産生させ、回収する。本発明における「宿主」とは、これらの動物、植物を包含する。

動物を使用する場合、哺乳類動物、昆虫を用いる産生系がある。哺乳類動物としては、ヤギ、ブタ、ヒツジ、マウス、ウシを用いることができる (Vicki Glaser, SPECTRUM Biotechnology Applications, 1993)。また、哺乳類動物を用いる場合、トランスジェニック動物を用いることができる。

例えば、目的とする DNA を、ヤギ β カゼインのような乳汁中に固有に産生されるタンパク質をコードする遺伝子との融合遺伝子として調製する。次いで、この融合遺伝子を含む DNA 断片をヤギの胚へ注入し、この胚を雌のヤギへ移植する。胚を受容したヤギから生まれるトランスジェニックヤギ又はその子孫が産生する乳汁から、目的のタンパク質を得ることができる。トランスジェニックヤギから産生されるタンパク質を含む乳汁量を増加させるために、適宜ホルモンをトランスジェニックヤギに使用してもよい (Ebert, K.M. et al., Bio/Technology (1994) 12, 699-702)。

また、昆虫としては、例えばカイコを用いることができる。カイコを用いる場合、目的のタンパク質をコードする DNA を挿入したバキュロウィルスをカイコに感染させることにより、このカイコの体液から目的のタンパク質を得ることができる (Susumu, M. et al., Nature (1985) 315, 592-594)。

さらに、植物を使用する場合、例えばタバコを用いることができる。タバコを用いる場合、目的とするタンパク質をコードする DNA を植物発現用ベクター、例えば pMON 530 に挿入し、このベクターをアグロバクテリウム・ツメファシエンズ (*Agrobacterium tumefaciens*) のようなバクテリアに導入する。このバクテリアをタバコ、例えば、ニコチアナ・タバカム (*Nicotiana tabacum*) に感染させ、本タバコの葉より所望のポリペプチドを得ることができる (Julian K.-C. Ma et al., Eur. J. Immunol. (1994) 24, 131-138)。

これにより得られた本発明のタンパク質は、形質転換細胞内または細胞外（培地など）から単離し、実質的に純粋で均一なタンパク質として精製することができる。タンパク質の分離、精製は、通常のタンパク質の精製で使用されている分離、精製方法を使用すればよく、何ら限定されるものではない。例えば、クロマトグラフィーカラム、フィルター、限外濾過、塩析、溶媒沈殿、溶媒抽出、蒸留、免疫沈降、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動、等電点電気泳動法、透析、再結晶等を適宜選択、組み合わせればタンパク質を分離、精製することができる。

クロマトグラフィーとしては、例えばアフィニティークロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、疎水性クロマトグラフィー、ゲル濾過、逆相クロマトグラフィー、吸着クロマトグラフィー等が挙げられる（Strategies for Protein Purification and Characterization: A Laboratory Course Manual. Ed Daniel R. Marshak et al., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1996）。これらのクロマトグラフィーは、液相クロマトグラフィー、例えばHPLC、FPLC等の液相クロマトグラフィーを用いて行うことができる。本発明は、これらの精製方法を用い、高度に精製されたタンパク質も包含する。

なお、タンパク質を精製前又は精製後に適当なタンパク質修飾酵素を作用させることにより、任意に修飾を加えたり部分的にペプチドを除去することもできる。タンパク質修飾酵素としては、例えば、トリプシン、キモトリプシン、リシルエンドペプチダーゼ、プロテインキナーゼ、グルコシダーゼなどが用いられる。

本発明は、また、本発明のタンパク質と結合する抗体を提供する。本発明の抗体の形態には、特に制限はなく、ポリクローナル抗体の他、モノクローナル抗体も含まれる。また、ウサギなどの免疫動物に本発明のタンパク質を免疫して得た抗血清、すべてのクラスのポリクローナル抗体およびモノクローナル抗体、さらにヒト抗体や遺伝子組み換えによるヒト型化抗体も含まれる。

抗体取得の感作抗原として使用される本発明のタンパク質は、その由来となる動物種に制限されないが哺乳動物、例えばヒト、マウス又はラット由来のタンパク質が好ましく、特にヒト由来のタンパク質が好ましい。ヒト由来のタンパク質は、本明細書に開示される遺伝子配列又はアミノ酸配列を用いて得ることができる。

本発明において、感作抗原として使用されるタンパク質は、完全なタンパク質であってもよいし、また、タンパク質の部分ペプチドであってもよい。タンパク質の部分ペプチドとしては、例えば、タンパク質のアミノ基 (N) 末端断片やカルボキシ (C) 末端断片が挙げられる。本明細書で述べる「抗体」とはタンパク質の全長又は断片に反応する抗体を意味する。

本発明のタンパク質又はその断片をコードする遺伝子を公知の発現ベクター系に挿入し、該ベクターで本明細書で述べた宿主細胞を形質転換させ、該形質転換細胞内外から目的のタンパク質又はその断片を公知の方法で得て、これらを感作抗原として用いればよい。また、タンパク質を発現する細胞又はその溶解物あるいは化学的に合成した本発明のタンパク質を感作抗原として使用してもよい。

感作抗原で免疫される哺乳動物としては、特に限定されるものではないが、細胞融合に使用する親細胞との適合性を考慮して選択するのが好ましく、一般的には、げっ歯目、ウサギ目、霊長目の動物が使用される。

げっ歯目の動物としては、例えば、マウス、ラット、ハムスター等が使用される。ウサギ目の動物としては、例えば、ウサギが使用される。霊長目の動物としては、例えば、サルが使用される。サルとしては、狭鼻下目のサル（旧世界ザル）、例えば、カニクイザル、アカゲザル、マントヒヒ、チンパンジー等が使用される。

感作抗原を動物に免疫するには、公知の方法にしたがって行われる。一般的な方法としては、感作抗原を哺乳動物の腹腔内又は皮下に注射する。具体的には、感作抗原を PBS (Phosphate-Buffered Saline) や生理食塩水等で適当量に希釈、

懸濁したものに對し、所望により通常のアジュバント、例えば、フロイント完全アジュバントを適量混合し、乳化後、哺乳動物に投与する。さらに、その後、フロイント不完全アジュバントに適量混合した感作抗原を、4～21日毎に数回投与することが好ましい。また、感作抗原免疫時に適当な担体を使用することができる。このように免疫し、血清中に所望の抗体レベルが上昇するのを常法により確認する。

ここで、本発明のタンパク質に対するポリクローナル抗体を得るには、血清中の所望の抗体レベルが上昇したことを確認した後、抗原を感作した哺乳動物の血液を取り出す。この血液から公知の方法により血清を分離する。ポリクローナル抗体としては、ポリクローナル抗体を含む血清を使用してもよいし、必要に応じこの血清からポリクローナル抗体を含む画分をさらに単離して、これを使用してもよい。例えば、本発明のタンパク質をカップリングさせたアフィニティーカラムを用いて、本発明のタンパク質のみを認識する画分を得て、さらにこの画分をプロテインAあるいはプロテインGカラムを利用して精製することにより、免疫グロブリンGあるいはMを調製することができる。

モノクローナル抗体を得るには、上記抗原を感作した哺乳動物の血清中に所望の抗体レベルが上昇するのを確認した後に、哺乳動物から免疫細胞を取り出し、細胞融合に付せばよい。この際、細胞融合に使用される好ましい免疫細胞として、特に脾細胞が挙げられる。前記免疫細胞と融合される他方の親細胞としては、好ましくは哺乳動物のミエローマ細胞、より好ましくは、薬剤による融合細胞選別のための特性を獲得したミエローマ細胞が挙げられる。

前記免疫細胞とミエローマ細胞の細胞融合は基本的には公知の方法、例えば、ミルステインらの方法(Galfre, G. and Milstein, C., *Methods Enzymol.* (1981) 73, 3-46)等に準じて行うことができる。細胞融合により得られたハイブリドーマは、通常の前記培養液、例えば、HAT培養液（ヒポキサンチン、アミノプテリンおよびチミジンを含む培養液）で培養することにより選択される。当該HAT

培養液での培養は、目的とするハイブリドーマ以外の細胞（非融合細胞）が死滅するのに十分な時間、通常、数日～数週間継続して行う。次いで、通常の限界希釈法を実施し、目的とする抗体を産生するハイブリドーマのスクリーニングおよびクローニングを行う。

また、ヒト以外の動物に抗原を免疫して上記ハイブリドーマを得る他に、ヒトリンパ球、例えば EB ウィルスに感染したヒトリンパ球を *in vitro* でタンパク質、タンパク質発現細胞又はその溶解物で感作し、感作リンパ球をヒト由来の永久分裂能を有するミエローマ細胞、例えば U266 と融合させ、タンパク質への結合活性を有する所望のヒト抗体を産生するハイブリドーマを得ることもできる（特開昭 63-17688 号公報）。

次いで、得られたハイブリドーマをマウス腹腔内に移植し、同マウスより腹水を回収し、得られたモノクローナル抗体を、例えば、硫酸沈殿、プロテイン A、プロテイン G カラム、DEAE イオン交換クロマトグラフィー、本発明のタンパク質をカップリングしたアフィニティーカラムなどにより精製することで調製することが可能である。本発明の抗体は、本発明のタンパク質の精製、検出に用いられる他、本発明のタンパク質のアゴニストやアンタゴニストの候補になる。また、この抗体を本発明のタンパク質が関与する疾患の抗体治療へ応用することも考えられる。得られた抗体を人体に投与する目的（抗体治療）で使用する場合には、免疫原性を低下させるため、ヒト抗体やヒト型抗体が好ましい。

例えば、ヒト抗体遺伝子のレパートリーを有するトランスジェニック動物に抗原となるタンパク質、タンパク質発現細胞又はその溶解物を免疫して抗体産生細胞を取得し、これをミエローマ細胞と融合させたハイブリドーマを用いてタンパク質に対するヒト抗体を取得することができる（国際公開番号 W092-03918、W093-2227、W094-02602、W094-25585、W096-33735 および W096-34096 参照）。

ハイブリドーマを用いて抗体を産生する以外に、抗体を産生する感作リンパ球等の免疫細胞を癌遺伝子（oncogene）により不死化させた細胞を用いてもよい。

このように得られたモノクローナル抗体はまた、遺伝子組換え技術を用いて産生させた組換え型抗体として得ることができる（例えば、Borrebaeck, C. A. K. and Larrick, J. W., THERAPEUTIC MONOCLONAL ANTIBODIES, Published in the United Kingdom by MACMILLAN PUBLISHERS LTD, 1990 参照）。組換え型抗体は、それをコードする DNA をハイブリドーマ又は抗体を産生する感作リンパ球等の免疫細胞からクローニングし、適当なベクターに組み込んで、これを宿主に導入し産生させる。本発明は、この組換え型抗体を包含する。

さらに、本発明の抗体は、本発明のタンパク質に結合する限り、その抗体断片や抗体修飾物であってよい。例えば、抗体断片としては、Fab、F(ab')₂、Fv 又は H 鎖と L 鎖の Fv を適当なリンカーで連結させたシングルチェーン Fv(scFv) (Huston, J. S. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. (1988) 85, 5879-5883) が挙げられる。具体的には、抗体を酵素、例えば、パパイン、ペプシンで処理し抗体断片を生成させるか、又は、これら抗体断片をコードする遺伝子を構築し、これを発現ベクターに導入した後、適当な宿主細胞で発現させる（例えば、Co, M. S. et al., J. Immunol. (1994) 152, 2968-2976 ; Better, M. and Horwitz, A. H., Methods Enzymol. (1989) 178, 476-496 ; Pluckthun, A. and Skerra, A., Methods Enzymol. (1989) 178, 497-515 ; Lamoyi, E., Methods Enzymol. (1986) 121, 652-663 ; Rousseaux, J. et al., Methods Enzymol. (1986) 121, 663-669 ; Bird, R. E. and Walker, B. W., Trends Biotechnol. (1991) 9, 132-137 参照）。

抗体修飾物として、ポリエチレングリコール (PEG) 等の各種分子と結合した抗体を使用することもできる。本発明の「抗体」にはこれらの抗体修飾物も包含される。このような抗体修飾物を得るには、得られた抗体に化学的な修飾を施すことによって得ることができる。これらの方法はこの分野において既に確立されている。

また、本発明の抗体は、公知の技術を使用して非ヒト抗体由来の可変領域とヒト抗体由来の定常領域からなるキメラ抗体又は非ヒト抗体由来の CDR（相補性決定領域）とヒト抗体由来の FR（フレームワーク領域）及び定常領域からなるヒト型化抗体として得ることができる。

前記のように得られた抗体は、均一にまで精製することができる。本発明で使用する抗体の分離、精製は通常のタンパク質で使用されている分離、精製方法を使用すればよい。例えば、アフィニティークロマトグラフィー等のクロマトグラフィーカラム、フィルター、限外濾過、塩析、透析、SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動、等電点電気泳動等を適宜選択、組み合わせれば、抗体を分離、精製することができる(Antibodies : A Laboratory Manual. Ed Harlow and David Lane, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988) が、これらに限定されるものではない。上記で得られた抗体の濃度測定は吸光度の測定又は酵素結合免疫吸着検定法(Enzyme-linked immunosorbent assay ; ELISA) 等により行うことができる。

。

アフィニティークロマトグラフィーに用いるカラムとしては、プロテイン A カラム、プロテイン G カラムが挙げられる。例えば、プロテイン A カラムを用いたカラムとして、Hyper D, POROS, Sepharose F. F. (Pharmacia) 等が挙げられる。

。

アフィニティークロマトグラフィー以外のクロマトグラフィーとしては、例えば、イオン交換クロマトグラフィー、疎水性クロマトグラフィー、ゲル濾過、逆相クロマトグラフィー、吸着クロマトグラフィー等が挙げられる(Strategies for Protein Purification and Characterization : A Laboratory Course Manual . Ed Daniel R. Marshak et al., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1996) ）。これらのクロマトグラフィーは HPLC、FPLC 等の液相クロマトグラフィーを用いて行うことができる。

また、本発明の抗体の抗原結合活性を測定する方法として、例えば、吸光度の測定、酵素結合免疫吸着検定法(Enzyme-linked immunosorbent assay ; ELISA)、EIA (酵素免疫測定法)、RIA (放射免疫測定法)あるいは蛍光抗体法を用いることができる。ELISAを用いる場合、本発明の抗体を固相化したプレートに本発明のタンパク質を添加し、次いで目的の抗体を含む試料、例えば、抗体産生細胞の培養上清や精製抗体を加える。酵素、例えば、アルカリフォスファターゼ等で標識した抗体を認識する二次抗体を添加し、プレートをインキュベーションし、次いで洗浄した後、p-ニトロフェニル燐酸などの酵素基質を加えて吸光度を測定することで抗原結合活性を評価することができる。タンパク質としてタンパク質の断片、例えばそのC末端からなる断片あるいはN末端からなる断片を使用してもよい。本発明の抗体の活性評価には、BIAcore(Pharmacia 製)を使用することができる。

これらの手法を用いることにより、本発明の抗体と試料中に含まれる本発明のタンパク質が含まれると予想される試料とを接触せしめ、該抗体と該タンパク質との免疫複合体を検出又は測定することからなる、本発明のタンパク質の検出又は測定方法を実施することができる。本発明のタンパク質の検出又は測定方法は、タンパク質を特異的に検出又は測定することができるため、タンパク質を用いた種々の実験等に有用である。

本発明はまた、ヒト「OATP-B」、「OATP-C」、「OATP-D」、または「OATP-E」タンパク質をコードするDNA（配列番号：1、3、5、または7）またはその相補鎖に相補的な少なくとも15ヌクレオチドを含むポリヌクレオチドを提供する。

ここで「相補鎖」とは、A:T、G:Cの塩基対からなる2本鎖DNAの一方の鎖に対する他方の鎖を指す。また、「相補的」とは、少なくとも15個の連続したヌクレオチド領域で完全に相補配列である場合に限られず、少なくとも70%、好ましくは少なくとも80%、より好ましくは90%、さらに好ましくは95%以上の塩基

配列上の相同性を有すればよい。相同性を決定するためのアルゴリズムは本明細書に記載したものを使用すればよい。

このような DNA には、本発明のタンパク質をコードする DNA の検出や増幅に用いるプローブやプライマー、本発明のタンパク質の発現を抑制するためのヌクレオチド又はヌクレオチド誘導体（例えば、アンチセンスオリゴヌクレオチドやリボザイム等）が含まれる。また、このような DNA は、DNA チップの作製に利用することもできる。

プライマーとして用いる場合、3' 側の領域を相補的にして、5' 側には制限酵素認識配列やタグなどを付加することができる。

アンチセンスオリゴヌクレオチドとしては、例えば、配列番号：1、3、5、または7の塩基配列中のいずれかの箇所にハイブリダイズするアンチセンスオリゴヌクレオチドが含まれる。このアンチセンスオリゴヌクレオチドは、好ましくは配列番号：1、3、5、または7の塩基配列中の連続する少なくとも15個以上のヌクレオチドに対するアンチセンスオリゴヌクレオチドである。さらに好ましくは、連続する少なくとも15個以上のヌクレオチドが翻訳開始コドンを含むアンチセンスオリゴヌクレオチドである。

アンチセンスオリゴヌクレオチドとしては、それらの誘導体や修飾体を使用することができる。修飾体として、例えばメチルホスホネート型又はエチルホスホネート型のような低級アルキルホスホネート修飾体、ホスホロチオエート修飾体又はホスホロアミデート修飾体等が挙げられる。

アンチセンスオリゴヌクレオチドは、DNA 又は mRNA の所定の領域を構成するヌクレオチドに対応するヌクレオチドが全て相補配列であるもののみならず、DNA または mRNA とオリゴヌクレオチドとが配列番号：1、3、5、または7に示される塩基配列に特異的にハイブリダイズできる限り、1又は複数個のヌクレオチドのミスマッチが存在していてもよい。

本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチド誘導体は、本発明のタンパク質の産生細胞に作用して、該タンパク質をコードする DNA 又は mRNA に結合することにより、その転写又は翻訳を阻害したり、mRNA の分解を促進したりして、本発明のタンパク質の発現を抑制することにより、結果的に本発明のタンパク質の作用を抑制する効果を有する。

本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチド誘導体は、それらに対して不活性な適当な基剤と混和して塗布剤、パップ剤等の外用剤とすることができる。

また、必要に応じて、賦形剤、等張化剤、溶解補助剤、安定化剤、防腐剤、無痛化剤等を加えて錠剤、散財、顆粒剤、カプセル剤、リボソームカプセル剤、注射剤、液剤、点鼻剤など、さらに凍結乾燥剤とすることができる。これらは常法にしたがって調製することができる。

本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチド誘導体は患者の患部に直接適用するか、又は血管内に投与するなどして結果的に患部に到達し得るように患者に適用する。さらには、持続性、膜透過性を高めるアンチセンス封入素材を用いることもできる。例えば、リボソーム、ポリ-L-リジン、リビッド、コレステロール、リポフェクチン又はこれらの誘導体が挙げられる。

本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチド誘導体の投与量は、患者の状態に応じて適宜調整し、好ましい量を用いることができる。例えば、0.1 ~100mg/kg、好ましくは 0.1 ~50mg/kg の範囲で投与することができる。

本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチドは本発明のタンパク質の発現を阻害し、従って本発明のタンパク質の生物学的活性を抑制することにおいて有用である。また、本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチドを含有する発現阻害剤は、本発明のタンパク質の生物学的活性を抑制することが可能である点で有用である。

本発明の応用としては、本発明のトランスポータータンパク質を利用した、薬物の体内吸収、体内動態の制御が挙げられる。本発明のトランスポータータンパ

ク質の基質特異性を詳細に解析することにより、このトランスポーターによって輸送され得る薬剤のドラッグデザインが可能であり、これにより本発明のトランスポータータンパク質を介して薬物の体内吸収を高めることができると考えられる。デザインされる薬物には従来の脂溶性をあげるような修飾は不要であるため、水溶性の扱いやすい薬物が迅速かつ効率的に開発できるようになると考えられる。また開発された薬物の吸収は基本的に本発明のトランスポータータンパク質の生体内分布に従うと考えられるため、臓器特異的な薬物の送達が可能である。特に本発明のトランスポータータンパク質の体内分布が、標的臓器と一致するような薬物の場合、理想的なドラッグデリバリーシステム(DDS)となると考えられる。また、他のトランスポーターによる薬物の吸収を期待しているが、本発明のトランスポータータンパク質による吸収は望ましくない場合、本発明のトランスポータータンパク質の基質特異性を考慮に入れたドラッグデザインを行うことにより、他のトランスポータータンパク質に選択的な薬物の創造が行えると考えられる。例えば、OATP-E は様々な固形癌細胞に高発現しているが、血球系細胞では極めて発現が少ないことが判明した。OATP-E 遺伝子を用いたスクリーニング系を構築し、これを用いたスクリーニングを行うことにより OATP-E により特異的に細胞内へ取り込まれる抗癌剤を得ることができれば、それは血球系細胞に対する障害が軽減された抗癌剤となり得ることが期待される。

本発明のタンパク質により細胞外から細胞内へ輸送される化合物のスクリーニングは、例えば、以下のように行うことができる。まず、本発明のタンパク質を細胞膜上に発現する細胞を提供する。例えば、本発明のタンパク質を発現するベクターを構築し、これを適当な細胞に導入すればよい。次いで、該細胞に対し、標識された被検化合物を接触させる。被検化合物としては、例えば、低分子化合物を用いることができる。被検化合物の標識としては、検出可能であれば特に制限はなく、例えば、放射標識、蛍光標識などが挙げられる。次いで、該細胞内に取り込まれた、標識された被検化合物を検出する。検出は、放射標識化合物の場

合は、液体シンチレーションカウンターなどによる放射活性の測定、蛍光標識化合物の場合は蛍光光度計などによる蛍光光度の測定により行うことができる。また、標識化合物を使わない場合においても、本発明のタンパク質により細胞内へ取り込まれた化合物の生物活性（例えば細胞毒性、細胞増殖促進活性）などを指標にしたバイオアッセイにより輸送量を測定することができる。次いで、上記検出の結果、該細胞内に取り込まれる化合物を選択する。具体的には、このスクリーニングは、例えば、実施例3に記載の輸送活性の検出系を利用して行うことができる。これにより単離された化合物は、上述した薬物の創造に利用することができる。

また、他の本発明の応用としては、本発明のトランスポータータンパク質を標的とした薬物の開発が考えられる。栄養物質や薬物の吸収機構として、あるいは薬物や生体内代謝物の排泄機構としてのトランスポーターの重要性を考えると、その機能が損なわれること、または異常に亢進することに起因する疾患が存在すると考えられる。そのような疾患に対しては、本発明のトランスポータータンパク質の機能を阻害、あるいは亢進する化合物や、本発明のトランスポーター遺伝子の発現量や、タンパク量を調節するするような化合物を薬剤として用いると効果的であると考えられる。

本発明のタンパク質のトランスポーター活性を促進または阻害する化合物のスクリーニングは、例えば、以下のように行うことができる。まず、本発明のタンパク質を細胞膜上に発現する細胞を提供する。次いで、該細胞に対し、被検化合物および本発明のタンパク質により輸送される標識された有機化合物を接触させる。用いられる有機化合物としては、例えば、エストラジオール-17 β -グルクロナイド、エストロン-3-スルフェート、ベンジルペニシリン、プロスタグランジン E2 などが挙げられるが、これらに制限されない。次いで、該細胞内に取り込まれた、標識された有機化合物の量を測定する。次いで、被検化合物非存在下において同様に測定した場合（対照）と比較して、該細胞内に取り込まれる標識さ

れた有機化合物の量を増加または減少させる化合物を選択する。具体的には、このスクリーニングは、例えば、実施例3に記載の輸送活性の検出系を利用して行うことができる。この結果、被検化合物の接触により、該細胞内に取り込まれる標識された有機化合物の量が増加すれば、該化合物は本発明のタンパク質の有機化合物を輸送する活性を促進すると判定される。一方、被検化合物の接触により、該細胞内に取り込まれた標識された有機化合物の量が減少すれば、該化合物は本発明のタンパク質の有機化合物を輸送する活性を阻害すると判定される。

本発明のスクリーニングにより得られる化合物は、本発明タンパク質を利用した薬剤治療や、本発明のタンパク質による物質輸送の制御を介した治療などへの応用が考えられる。本発明のスクリーニング方法を用いて得られる化合物は、その構造の一部を、付加、欠失及び／又は置換により変換してもよい。

本発明のタンパク質に結合する化合物や本発明のタンパク質およびその部分ペプチドをヒトや哺乳動物、例えばマウス、ラット、モルモット、ウサギ、ニワトリ、ネコ、イヌ、ヒツジ、ブタ、ウシ、サル、マントヒヒ、チンパンジーの医薬として使用する場合には、タンパク質や単離された化合物自体を直接患者に投与する以外に、公知の製剤学的方法により製剤化して投与を行うことも可能である。例えば、必要に応じて糖衣を施した錠剤、カプセル剤、エリキシル剤、マイクロカプセル剤として経口的に、あるいは水もしくはそれ以外の薬学的に許容し得る液との無菌性溶液、又は懸濁液剤の注射剤の形で非経口的に使用できる。例えば、薬理学上許容される担体もしくは媒体、具体的には、滅菌水や生理食塩水、植物油、乳化剤、懸濁剤、界面活性剤、安定剤、香味剤、賦形剤、ベヒクル、防腐剤、結合剤などと適宜組み合わせ、一般に認められた製薬実施に要求される単位用量形態で混和することによって製剤化することが考えられる。これら製剤における有効成分量は指示された範囲の適当な容量が得られるようにするものである。

錠剤、カプセル剤に混和することができる添加剤としては、例えばゼラチン、コーンスターチ、トラガントガム、アラビアゴムのような結合剤、結晶性セルロースのような賦形剤、コーンスターチ、ゼラチン、アルギン酸のような膨化剤、ステアリン酸マグネシウムのような潤滑剤、ショ糖、乳糖又はサッカリンのような甘味剤、ペパーミント、アカモノ油又はチェリーのような香味剤が用いられる。調剤単位形態がカプセルである場合には、上記の材料にさらに油脂のような液状担体を含有することができる。注射のための無菌組成物は注射用蒸留水のようなベヒクルを用いて通常の製剤実施に従って処方することができる。

注射用の水溶液としては、例えば生理食塩水、ブドウ糖やその他の補助薬を含む等張液、例えばD-ソルビトール、D-マンノース、D-マンニトール、塩化ナトリウムが挙げられ、適当な溶解補助剤、例えばアルコール、具体的にはエタノール、ポリアルコール、例えばプロピレングリコール、ポリエチレングリコール、非イオン性界面活性剤、例えばポリソルベート 80 (TM)、HCO-50 と併用してもよい。

油性液としてはゴマ油、大豆油があげられ、溶解補助剤として安息香酸ベンジル、ベンジルアルコールと併用してもよい。また、緩衝剤、例えばリン酸塩緩衝液、酢酸ナトリウム緩衝液、無痛化剤、例えば、塩酸プロカイン、安定剤、例えばベンジルアルコール、フェノール、酸化防止剤と配合してもよい。調製された注射液は通常、適当なアンプルに充填させる。

患者への投与は、例えば、動脈内注射、静脈内注射、皮下注射などのほか、鼻腔内的、経気管支的、筋内的、経皮的、または経口的に当業者に公知の方法により行いうる。投与量は、患者の体重や年齢、投与方法などにより変動するが、当業者であれば適当な投与量を適宜選択することが可能である。また、該化合物がDNAによりコードされうるものであれば、該DNAを遺伝子治療用ベクターに組み込み、遺伝子治療を行うことも考えられる。投与量、投与方法は、患者の体重や年

齡、症状などにより変動するが、当業者であれば適宜選択することが可能である。

本発明の DNA は、本発明のタンパク質の活性異常や発現量異常に起因する疾患に対する遺伝子治療への応用も考えられる。遺伝子治療に用いる場合には、本発明の DNA をアデノウイルスベクター（例えば、pAdexLcw）やレトロウイルスベクター（例えば、pZIPneo）などに挿入して、生体内に投与する。投与方法は、ex vivo 法であっても、in vivo 法であってもよい。また、アンチセンス合成 DNA を生体内に直接、または上記ベクターに挿入して投与して治療を行うことも考えられる。また、本発明のタンパク質の活性異常や発現量異常に起因する疾患の診断への応用も考えられる。

図面の簡単な説明

図 1 は、RT-PCR 法により、ヒト胎児組織、および成体組織における各 OATP ファミリー遺伝子の発現を調べた結果を示す写真である。1. 胎児脳、2. 胎児心臓、3. 胎児腎臓、4. 胎児肝臓、5. 胎児肺、6. 胎児骨格筋、7. 胎児脾臓、8. 胎児胸腺、9. 成体脾臓、10. 成体腎臓、11. 成体骨格筋、12. 成体肝臓、13. 成体肺、14. 成体胎盤、15. 成体脳、16. 成体心臓、17. 成体末梢血白血球、18. 成体大腸、19. 成体小腸、20. 成体卵巣、21. 成体精巣、22. 成体前立腺、23. 成体胸腺、24. 成体脾臓、25. 成体骨髓、26. 成体リンパ節、27. 成体扁桃腺。

図 2 は、RT-PCR 法により、ヒト癌細胞における各 OATP ファミリー遺伝子の発現を調べた結果を示す写真である。1. 乳癌細胞 (GI-101)、2. 肺癌細胞 (LX-1)、3. 大腸腺腫細胞 (CX-1)、4. 肺癌細胞 (GI-117)、5. 前立腺腫細胞 (PC3)、6. 大腸腺腫細胞 (GI-112)、7. 卵巣癌細胞 (GI-102)、8. 脾臓腺腫細胞 (GI-103)。

図3は、各種ラベル体に対するトランスポート実験の結果を示す図である。OATP-Cを導入した HEK293 細胞 (OATP-C)、およびベクターのみを導入した HEK293 細胞 (モック) における各種ラベル体の輸送活性を表す。

図4は、OATP-Cを発現させた HEK293 細胞の各種濃度における PCG の輸送活性を示す図である。

図5は、OATP-Cを発現させた HEK293 細胞の PCG 輸送活性に対する各種 β ラクタム系抗生物質の影響を示す図である。コントロール (阻害剤無し) における活性を 100%として表してある。

図6は、エストラジオール-17 β -グルクロナイド輸送活性におけるナトリウムイオン、および塩素イオンの要求性を示す図である。「OATP-C」は OATP-C を導入した HEK293 細胞、および「モック」はベクターのみを導入した HEK293 細胞におけるエストラジオール-17 β -グルクロナイドの輸送活性をそれぞれ表す。

発明を実施するための最良の形態

以下、本発明を実施例によりさらに詳細に説明するが、本発明はこれら実施例に制限されるものではない。一般的な分子生物学的な実験操作に関しては、基本的に、Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T. 著「Molecular Cloning」Cold Spring Harbor Lab. (1989) などの一般的な実験書に記載の方法に従った。

【実施例1】 OATP-B, C, D および E 遺伝子の全オープンリーディングフレーム (ORF) を含む cDNA のクローニング

OATP-B

ヒト OATP-A と有意な相同性を示すアミノ酸配列をコードし得る EST である W1 9504 および AI052501 の塩基配列をもとに、それぞれ OABE-1 プライマー (5' gat aag ctt ctg tgt ggc cca aga aga act gac 3' / 配列番号: 9) および OABE-6 プライマー (5' gat aag ctt tac tgc tgt ggc tgc tac tct tgg 3' / 配列番号: 10) を作製した。これらのプライマーを用い、ヒト成体脳 polyA⁺ RNA 由

来 cDNA を鋳型として PCR を行い、全 ORF を含む OATP-B cDNA を増幅した。PCR により増幅した OATP-B cDNA をプライマーに付加した Hind III サイトにより切断し、哺乳動物細胞用発現ベクターである pcDNA3 ベクター (Invitrogen 社) の Hind III サイトに組み込んだ。複数のクローンをシーケンシングすることにより PCR エラーの無いクローン (pcDNA3/OATP-B) を選択し、発現実験に用いた。

OATP-C

ヒト OATP-A と有意な相同性を示すアミノ酸配列をコードし得る以下の EST の塩基配列からそれぞれのプライマーを作製した。

EST H62893 ; 2893-4 プライマー (5' aag ctt ccg tca ata aaa cca aca 3' / 配列番号 : 1 1) および 2893-1 プライマー (5' ctt ctc ttg ttg gtt tta ttg acg 3' / 配列番号 : 1 2)

EST R29414 ; 9414-2 プライマー (5' tgt aag tta ttc cat tgt ttc cac 3' / 配列番号 : 1 3)

EST T73863 ; 3863-1 プライマー (5' ttg gtg ctt tta ctt atg tct tca 3' / 配列番号 : 1 4)

これらのプライマーを用い、3つの断片に分けヒト OATP-C のクローニングを行った。

5' 側断片は、5' RACE (Rapid Amplification cDNA Ends) 法によりクローニングした。すなわち、ヒト胎児肝臓由来 Marathon-Ready™ cDNA (CLONTECH 社) を鋳型とし、キットに附属のリンカープライマーである AP1 プライマーと 2893-4 プライマーとの組み合わせによる PCR を行い、ヒト OATP-C cDNA の 5' 側断片、約 400bp を増幅した。この cDNA 断片を pT7Blue-T ベクター (Novagen 社) に TA クローニング法により組み込み、得られたサブクローンを複数シーケンシングすることによりヒト OATP-C cDNA の 5' 側の配列を決定した。また、3' 側も同様に 3' RACE 法によりクローニングした。すなわち、ヒト胎児肝臓由来 Marathon-Ready™ cDNA を鋳型とし、キットに附属のリンカープライマーである AP1 プライ

マーと 3863-1 プライマーとの組み合わせの PCR によりヒト OATP-C cDNA の 3' 側断片、約 1.5kbp を増幅した。この cDNA 断片を pT7Blue-T ベクターに TA クローニング法により組み込み、得られたサブクローンを複数シーケンシングすることによりヒト OATP-C cDNA の 3' 側の配列を決定した。さらにこれらの間に挟まれる中央部は、ヒト成体肝臓由来 cDNA を鋳型とし、2893-1 プライマーと 9414-2 プライマーとの組み合わせによる PCR により増幅した。得られた約 1.2kbp の断片をゲル濾過法により精製し、直接シーケンシングすることにより配列を決定した。この様にして得られた配列を組み合わせることにより、ヒト OATP-C の全 ORF を含む cDNA の配列を決定した。

発現用のプラスミドは以下のようにして構築した。すなわち、ヒト成体肝臓由来 cDNA を鋳型とし、以下のプライマーの組み合わせによる PCR によりヒト OATP-C を 2 つの断片に分け増幅した。

5' 側

0AHC17 プライマー (5' gat ggt acc aaa ctg agc atc aac aac aaa aac 3' / 配列番号: 15)

0AHC18 プライマー (5' gat ggt acc cat cga gaa tca gta gga gtt atc 3' / 配列番号: 16)

3' 側

0AHC21 プライマー (5' gat ggt acc tac cct ggg atc tct gtt ttc taa 3' / 配列番号: 17)

0AHC22 プライマー (5' gat ggt acc gtt tgg aaa cac aga agc aga agt 3' / 配列番号: 18)

これらの断片をそれぞれ pT7Blue-T ベクターにサブクローニングし、PCR エラーのないクローンを選択した。重なり合う領域に存在する Bgl II サイトで両者を連結した後、両端に存在する Kpn I サイトで切断し、pcDNA3 ベクターの Kpn I サイトに組み込み、発現用プラスミド pcDNA3/OATP-C を得た。

OATP-D

ヒト OATP-A と有意な相同性を示すアミノ酸配列をコードし得る EST AA280224 から 0224-3 プライマー (5' cgc cct cgt ggt ttt tga tgt agc 3' / 配列番号 : 19) を作製した。さらに、ヒト第 15 番染色体 q26.1 領域由来の PAC クローン (pDJ430i19) の配列の一部もヒト OATP-A と有意な相同性を示すアミノ酸配列をコードし得ることを見いだした。この配列から PAC151-2 プライマー (5' gcg gtg cct tac tct tct tct ctt 3' / 配列番号 : 20) を作製した。ヒト成体脳由来 cDNA を鋳型とし、これらのプライマーを用いた PCR を行ったところ約 1.1kbp の cDNA 断片が増幅された。これをプローブとし、ヒト成体腎臓由来 5'-STRETCH PLUS cDNA ライブラリー (CLONTECH 社) に対しブラークハイブリダイゼーション法によるスクリーニングを行った。得られたポジティブクロンのファージ懸濁液を鋳型とし、上記のプライマー、あるいは明らかになった配列から作製した OATP-D 遺伝子特異的なプライマーと、λgt-10 ベクターの配列から作製した GT10 S1 プライマー (5' ctt ttg agc aag ttc agc ct 3' / 配列番号 : 21)、あるいは GT10 A1 プライマー (5' aga ggt ggc tta tga gta ttt ctt 3' / 配列番号 : 22) との組み合わせによる PCR を行い、増幅断片を直接シーケンシングすることにより配列を決定した。さらに、新たに得られた領域を含む DNA 断片をプローブとして用いスクリーニングを行うことにより、ファージクローンによりカバーされる領域を延長していき、全 ORF の配列を決定した。

OATP-E

ヒト OATP-A と有意な相同性を示すアミノ酸配列をコードし得る EST AI347130 から、7130-1 プライマー (5' tgt aca agg tgc tgg gcg tcc tct 3' / 配列番号 : 23)、および 7130-4 プライマー (5' cga tcg ggt ata aaa cac att cta 3' / 配列番号 : 24) を作製した。ヒト成体肺由来 cDNA を鋳型とし、これらのプライマーを用いた PCR を行ったところ約 400bp の cDNA 断片が増幅された。これをプローブとし、ヒト成体腎臓由来 5'-STRETCH PLUS cDNA ライブラリー (CLONT

ECH社) に対しブランクハイブリダイゼーション法によるスクリーニングを行った。得られたポジティブクローンのファージ懸濁液を鋳型とし、上記のプライマー、あるいは明らかになった配列から作製した OATP-E 遺伝子特異的なプライマーと、 λ gt-10 ベクターの配列から作製した GT10 S1 プライマー、あるいは GT10 A1 プライマーとの組み合わせによる PCR を行い、増幅断片を直接シーケンシングすることにより配列を決定した。さらに、新たに得られた領域を含む DNA 断片をプローブとして用いスクリーニングを行うことにより、ファージクローンによりカバーされる領域を延長していき、全 ORF の配列を決定した。

発現用のプラスミドは以下のようにして構築した。すなわち、以下のプライマーの組み合わせによる PCR によりヒト OATP-E を 5' 側および 3' 側の 2 つの断片に分け増幅した。5' 側断片はヒト成体肺由来 cDNA を、また 3' 側断片はヒト胎児肺由来 cDNA を鋳型とし増幅した。

5' 側

OAE17 プライマー (5' gat aag ctt tgc gtg gct gaa gcc tcg aag tca 3' / 配列番号: 25)

OAE18 プライマー (5' gat gga tcc act ggt gca ttt ccg ccg ctc tca 3' / 配列番号: 26)

3' 側

OAE21 プライマー (5' gat aag ctt tct tca ccg ccg ttc cca tcc ttg 3' / 配列番号: 27)

OAE22 プライマー (5' gat gga tcc act gtt ctg tca tca gga aat gct 3' / 配列番号: 28)

これらの断片をそれぞれ pcDNA3 ベクターの Hind III / BamH I サイトにサブクローニングし、PCR エラーのないクローンを選択した。重なり合う領域に存在する BstP I サイトで両者を連結し、発現用プラスミド pcDNA3/OATP-E を得た。

PCR

PCR は基本的に以下に示す条件を基本とし、適宜変更を加えて行った。

<反応液組成>

鋳型 DNA

10 x ExTaq バッファー (TaKaRa 社) 5 μ l

2.5mM dNTPs (TaKaRa 社) 4 μ l

ExTaq (TaKaRa 社) 0.5 μ l

TaqStartTM Antibody (CLONTECH) 0.5 μ l

センスプライマー 10~20pmol

アンチセンスプライマー 10~20pmol

/全量 50 μ l

<反応条件>

一般的な PCR

94°C、2 分 \rightarrow (94°C、30 秒 \rightarrow 55°C~62°C、30 秒 \rightarrow 72°C、2~3 分) x 25~40
サイクル \rightarrow 72°C、10 分

RACE 法

94°C、2 分 \rightarrow (94°C、30 秒 \rightarrow 68°C、4 分) x 5 サイクル \rightarrow (94°C、30 秒 \rightarrow 6
2°C、30 秒 \rightarrow 72°C、2 分) x 30 サイクル \rightarrow 72°C、10 分

cDNA の合成

PCR の鋳型として用いる cDNA は、SUPERSCRIPTM II RNase H⁻ 逆転写酵素 (GIBCO BRL 社) を用い、メーカー推奨の一般的な方法に従って作製した。すなわち、10 μ g の全 RNA、あるいは 2 μ g のポリ A⁺ RNA と、約 1 μ g のオリゴ dT プライマー (GIBCO BRL 社)、あるいは約 0.5 μ g のランダムヘキサマープライマー (GIBCO BRL 社) を混合し、70°C で 10 分加温した後氷冷した。これに first strand 緩衝液 (GIBCO BRL 社)、終濃度 10mM の DTT、終濃度 0.5mM の dNTPs (GIBCO BRL 社)、および 400U~800U の SUPERSCRIPTM II RNase H⁻ 逆転写酵素を加え、42

℃で1時間保温することにより cDNA 合成を行った。次いで 70℃で 15 分間加温し、その一部を鋳型として使用した。

ハイブリダイゼーション

PCR により増幅した DNA 断片、あるいはアガロース電気泳動後のゲルから精製した DNA 断片などを、Ready-to Go DNA labelling beads (Pharmacia 社)を用いたランダムプライマー法により [α -³²P]dCTP でラベルし、プローブとして用いた。ハイブリダイゼーションは、ExpressHyb Hybridization Solution (CLONTECH 社)を用い、メーカー推奨の方法に従い、68℃で 2 時間以上保温することにより行った。ハイブリダイゼーションの後、フィルターを、2 x SSC, 0.1% SDS 溶液中、室温で、20 分、2 回洗浄し、次いで、0.1 X SSC, 0.1% SDS 溶液中、50℃で、20 分、2 回の洗浄を行った。

【実施例 2】 RT-PCR 法による解析

以下に示すそれぞれの遺伝子に特異的なプライマーを用い、RT-PCR 法による各遺伝子発現の組織分布の解析を行った。

OATP-A

OAA-1 プライマー (5' aag aag agg tca aga agg aaa aat 3' / 配列番号 : 2 9)

OAA-2 プライマー (5' gga gca tca agg aac agt cag gtc 3' / 配列番号 : 3 0)

OATP-B

4742-1 プライマー (5' cgt gcg gcc aag tgt gtt cca taa 3' / 配列番号 : 3 1)

4742-2 プライマー (5' gaa gga gta gcc cca tag cca atc 3' / 配列番号 : 3 2)

OATP-C

9414-1 プライマー (5' tgt cat tgt cct ttt acc tat tat 3' / 配列番号 : 3 3)

9414-2 プライマー (前出 5' tgt aag tta ttc cat tgt ttc cac 3' / 配列番号 : 1 3)

OATP-D

0224-2 プライマー (5' ctc aaa tcc ttc gcc ttc atc ctg 3' / 配列番号 : 3 4)

0224-4 プライマー (5' agg gtc aga gta gag gca aag aac 3' / 配列番号 : 3 5)

OATP-E

7130-2 プライマー (5' cac ggc ggg cac tca gca ttt cct 3' / 配列番号 : 3 6)

7130-4 プライマー (前出 5' cga tcg ggt ata aaa cac att cta 3' / 配列番号 : 2 4)

G3PDH

Upstream プライマー (5' TGAAGGTCGGAGTCAACGGATTTGGT 3' / 配列番号 : 3 7)

Downstream プライマー (5' CATGTGGGCCATGAGGTCCACCAC 3' / 配列番号 : 3 8)

Multiple Tissue cDNA (MTC™) Panel (CLONTECH 社) に含まれる、各種臓器、細胞由来の cDNA の適当量を鋳型として用い、上記プライマーを用いて PCR を行った。増幅産物をアガロース電気泳動し解析を行った (図 1、図 2)。OATP-A は脳、肝臓に比較的局限した発現パターンを示した。また、OATP-C は胎児組織においても成体組織においても、肝臓に発現が局限していることが明らかとなった。OATP-B、OATP-D、OATP-E は比較的広範囲の組織において発現が見られたが、特に、OATP-B、OATP-E においては末梢血白血球や、胸腺、脾臓において発現が極めて低いことが明らかとなった。このことから、OATP-B、OATP-E は血球系細胞における発現が低いことが強く示唆される。一方、癌細胞における発現を調

べたところ（図2）、OATP-D および OATP-E は癌細胞において高頻度で発現していることが明らかとなった。この結果から、OATP-E によって特異的に細胞に取り込まれる抗癌剤を作ることが可能であれば、それは造血細胞に対する副作用（骨髄抑制など）が軽減した抗癌剤となり得ることが期待される。

【実施例3】 トランスポート実験

pcDNA3/OATP-C、及びコントロールとしてインサートを含まない pcDNA3 ベクター（モック）を、リン酸カルシウム法によりヒト胎児腎臓由来細胞株 HEK293 細胞に導入した。すなわち、プラスミド DNA10 μ g、ヘベス緩衝液(137mM NaCl、5mM KCl、0.7mM Na₂HPO₄、6mM デキストロース、21mM ヘベス pH7.1) 1ml、2M CaCl₂ 62.5 μ l を混合し、30 分以上室温で静置する事によりリン酸カルシウム共沈物を生成させた。10cm プレート 1 枚あたり 1.5 x 10⁶ 個の細胞を蒔き、24 時間培養した後、先のリン酸カルシウム共沈物を加え 24 時間培養し、その後 PBS (Phosphate buffered saline) でプレートを洗浄し、培地を加えさらに 24 時間培養した。

プラスミド DNA を導入した細胞を用いて以下の手順に従ってトランスポート実験を行った。プレートからラバーボリスマンを用いて細胞をはがし、トランスポート緩衝液 (125mM NaCl、4.8mM KCl、5.6mM (+)-グルコース、1.2mM CaCl₂、1.2mM KH₂PO₄、1.2mM MgSO₄、25mM ヘベス pH7.4) に懸濁し、20 分間ブレインキューベーションを行った。ついで各種基質のラベル体 ([³H]メトトレキセート、[³H]ジゴキシン、[³H]ウワバイン、[³H]プロスタグランジン E2、[³H]エストラジオール-17 β -グルクロナイド、[³H]エストロン-3-スルフェート、[¹⁴C]PCG<ベンジルペニシリン>など) を適当量添加し、37°C にて一定時間インキュベートを行った。これを、3M KCl 層の上にシリコンオイルと液体パラフィンの混合物（比重=1.022）を重層して作製したシリコンレイヤー上に重層し、遠心する事により細胞を分離した。細胞の放射活性を測定し、細胞内へのトランスポート能とした。なおこの際、1 x 10⁶ 個の細胞を 1 ポイントとして用いた。

また、HEK293 細胞の培養は、ダルベッコ MEM, 10% FCS (ウシ胎児血清) を培地とし、5%二酸化炭素中、37°Cで行った。

OATP-C を発現させた HEK293 細胞における輸送活性を測定したところ、エストラジオール-17 β -グルクロナイド、エストロン-3-スルフェート、PCG において明らかな輸送が観察された。また、メトトレキセート、ウワバイン、プロスタグランジン E2 においても弱い活性が観察された (図 3)。

次に、OATP-C の PCG 輸送における K_m (ミカエリス定数) 値を求めるために、様々な濃度の [^{14}C]PCG を加えた場合の取り込み量を測定した (図 4)。OATP-C を発現させた細胞における PCG の取り込み量を Lineweaver-Burk 逆数プロットすることにより、 K_m 値は $983 \pm 289 \mu M$ であることが求められた。また反応の最大速度 V_{max} は 5.45 ± 0.63 (nmol/mg/15 min) であることが求められた。

次に、OATP-C による PCG の輸送に対する、各種 β ラクタム系抗生物質の影響を調べた (図 5)。4 μM の [^{14}C]PCG に対して各種 β ラクタム系抗生物質を 1mM 添加してその輸送活性への影響を調べたところ、セファゾリン、セフォペラゾン、セフピラミド、ナフシリンにおいて顕著な阻害活性が観察された。また、セファロリジン、セファレキシンによっても弱い阻害活性が観察された。この結果より、これらの β ラクタム系抗生物質も、同じ β ラクタム系抗生物質である PCG と同様に、OATP ファミリータンパクにより輸送され得ることが強く示唆される。

次に、OATP-C によるエストラジオール-17 β -グルクロナイドの輸送におけるナトリウムイオン、および塩素イオンの要求性を調べた (図 6)。トランスポート緩衝液におけるナトリウムイオンを N-メチルグルカミンに変更した場合においても、また、塩素イオンをグルコネートに変更した場合においても、エストラジオール-17 β -グルクロナイドの輸送は変化を受けなかった。このことから、OATP-C による輸送はナトリウムイオン非依存的であることがわかった。

本発明により、新規なトランスポータータンパク質およびその遺伝子が提供された。これらは、本発明のトランスポータータンパク質を介して輸送される新規なデザインの薬物の開発や本発明のトランスポータータンパク質の発現異常や機能異常などに起因する疾患の治療薬の開発に利用することが可能である。さらには遺伝子診断などの診断や遺伝子治療への応用も考えられる。例えば、本発明のトランスポーター遺伝子の SNP 診断などにより、薬物の有効性に関する個人差を考慮したテーラーメイドの治療計画が可能になる。

請求の範囲

1. トランスポーター活性を有するタンパク質をコードする下記 (a) から (d) のいずれかに記載の DNA。

(a) 配列番号：2、4、6、または8に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質をコードする DNA。

(b) 配列番号：1、3、5、または7に記載の塩基配列のコード領域を含む DNA。

(c) 配列番号：2、4、6、または8に記載のアミノ酸配列において1若しくは複数のアミノ酸が置換、欠失、挿入、および／または付加したアミノ酸配列からなるタンパク質をコードする DNA。

(d) 配列番号：1、3、5、または7に記載の塩基配列からなる DNA とハイブリダイズする DNA。

2. 配列番号：2、4、6、または8に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質の部分ペプチドをコードする DNA。

3. 請求項1または2に記載の DNA が挿入されたベクター。

4. 請求項1若しくは2に記載の DNA または請求項3に記載のベクターを保持する形質転換細胞。

5. 請求項1または2に記載の DNA によりコードされるタンパク質またはペプチド。

6. 請求項4に記載の形質転換細胞を培養し、該細胞またはその培養上清から発現させたタンパク質を回収する工程を含む、請求項5に記載のタンパク質またはペプチドの製造方法。

7. 請求項5に記載のタンパク質に結合する抗体。

8. 配列番号：1、3、5、または7に記載の塩基配列からなる DNA またはその相補鎖に相補的な少なくとも15ヌクレオチドを含むポリヌクレオチド。

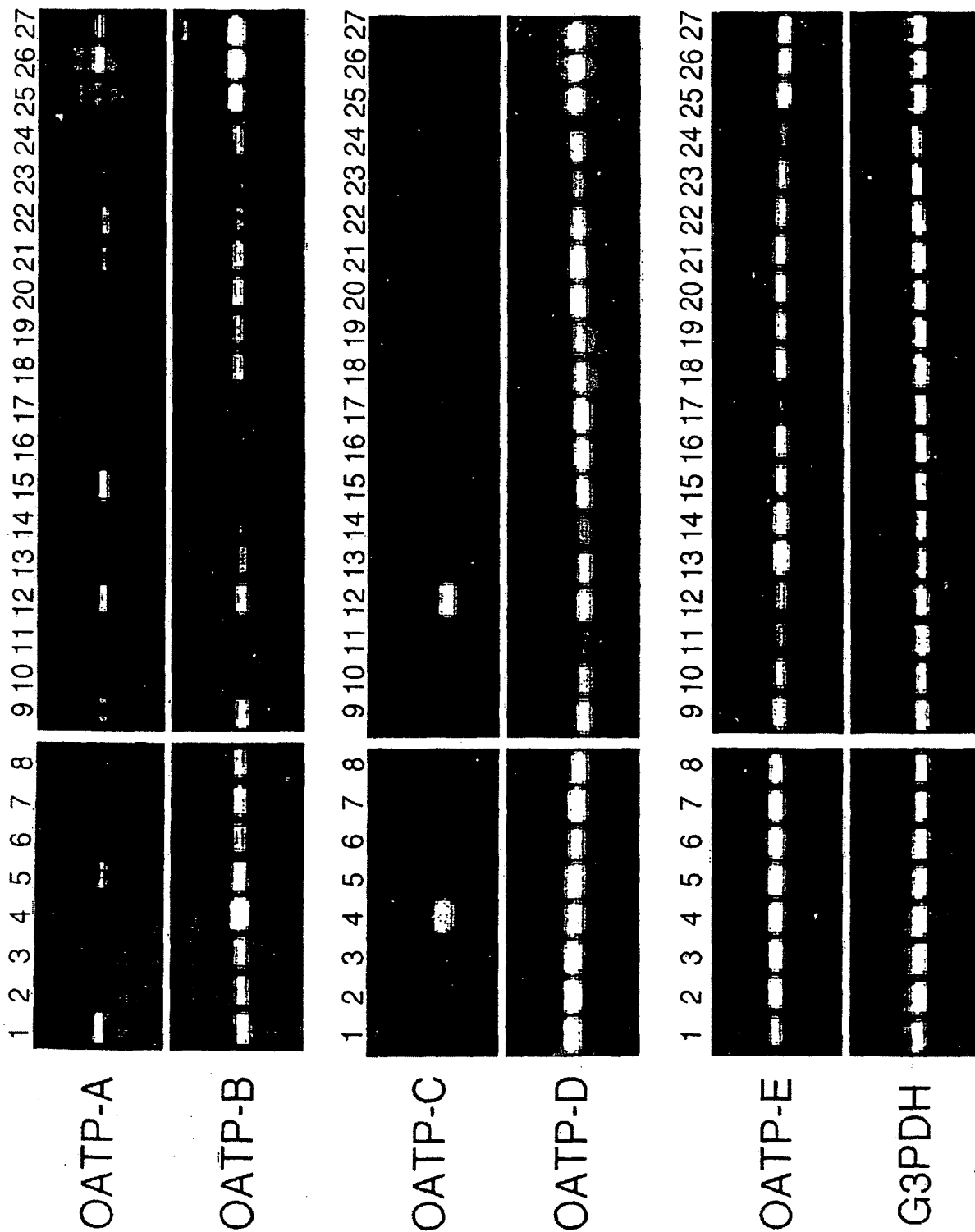
9. 請求項 5 に記載のタンパク質により細胞外から細胞内へ輸送される化合物をスクリーニングする方法であって、

- (a) 請求項 5 に記載のタンパク質を細胞膜上に発現する細胞を提供する工程、
- (b) 該細胞に対し、標識された被検化合物を接触させる工程、
- (c) 該細胞内に取り込まれた、標識された被検化合物を検出する工程、および
- (d) 該細胞内に取り込まれる化合物を選択する工程、を含む方法。

10. 請求項 5 に記載のタンパク質のトランスポーター活性を促進または阻害する化合物をスクリーニングする方法であって、

- (a) 請求項 5 に記載のタンパク質を細胞膜上に発現する細胞を提供する工程、
- (b) 該細胞に対し、被検化合物および請求項 5 に記載のタンパク質により輸送される標識された有機化合物を接触させる工程、
- (c) 該細胞内に取り込まれた、標識された有機化合物の量を測定する工程、および
- (d) 被検化合物非存在下において測定した場合（対照）と比較して、該細胞内に取り込まれる標識された有機化合物の量を増加または減少させる化合物を選択する工程、を含む方法。

図 1



2 / 6

図 2

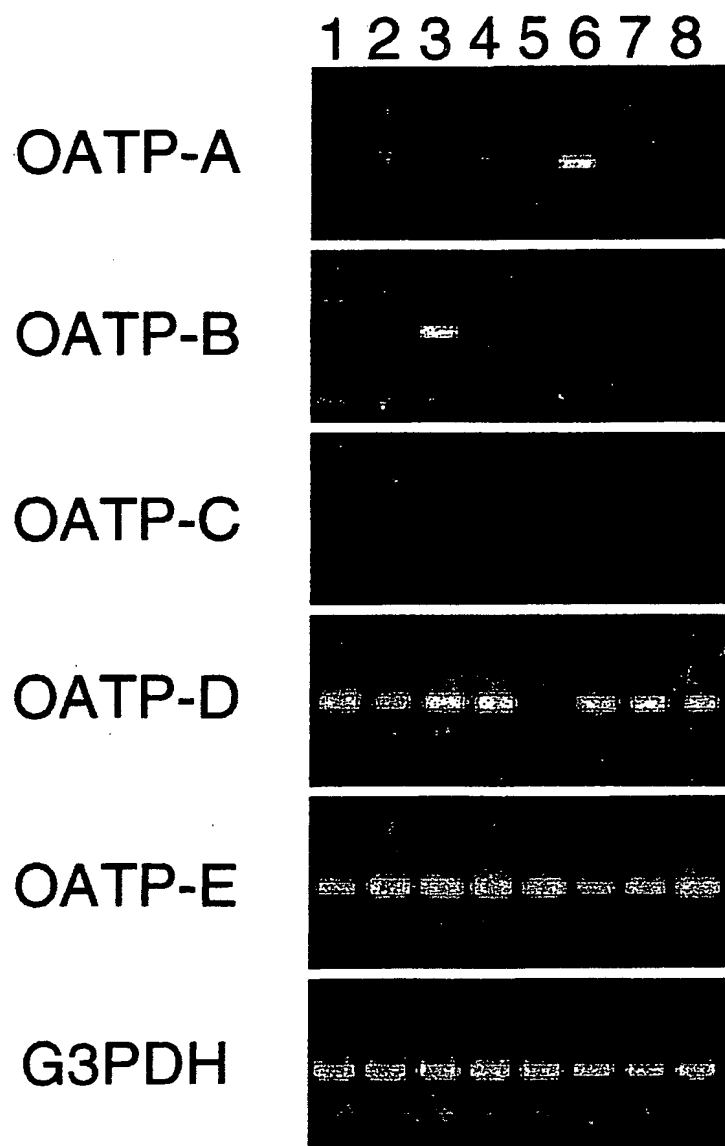


図 3

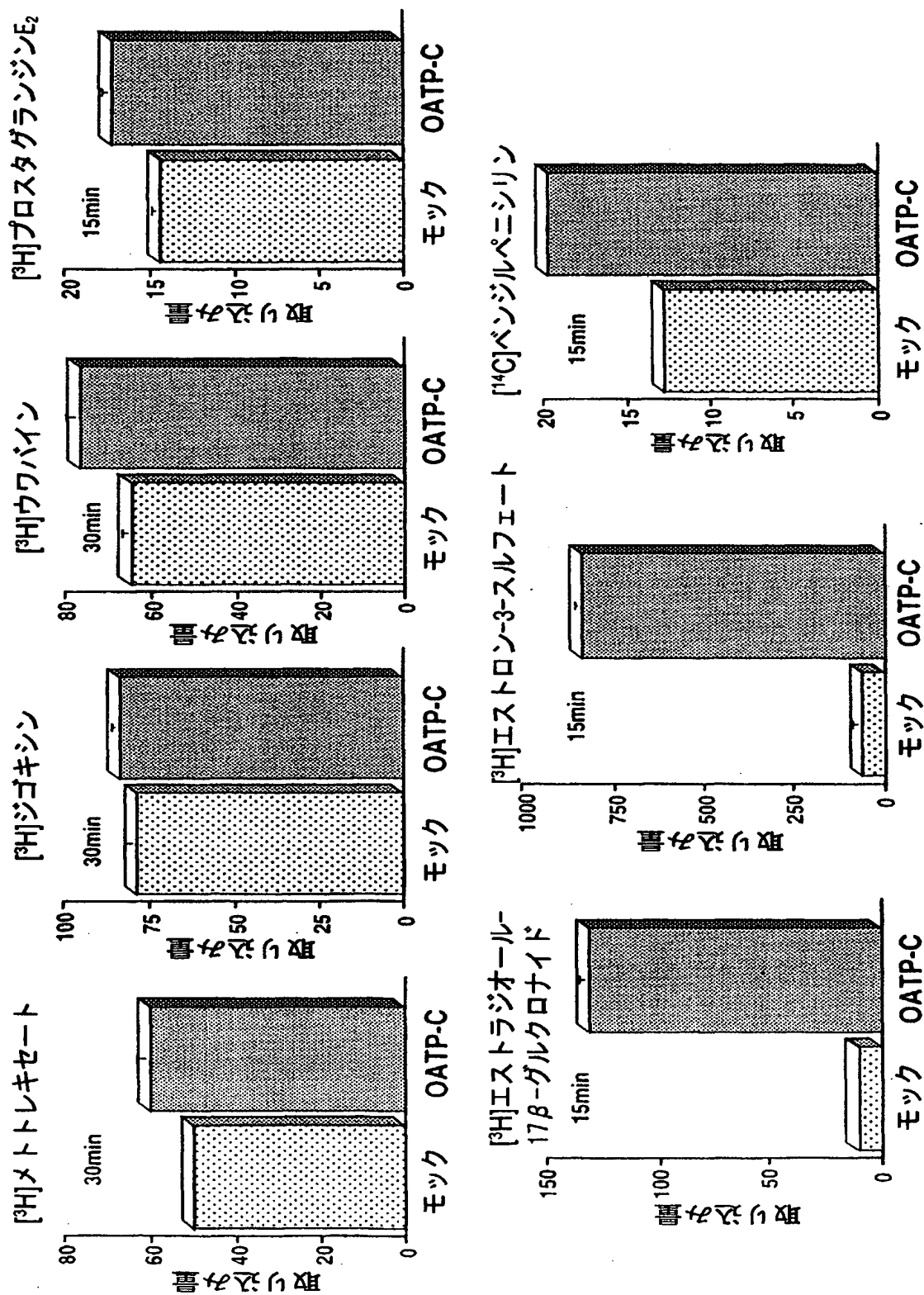


図 4

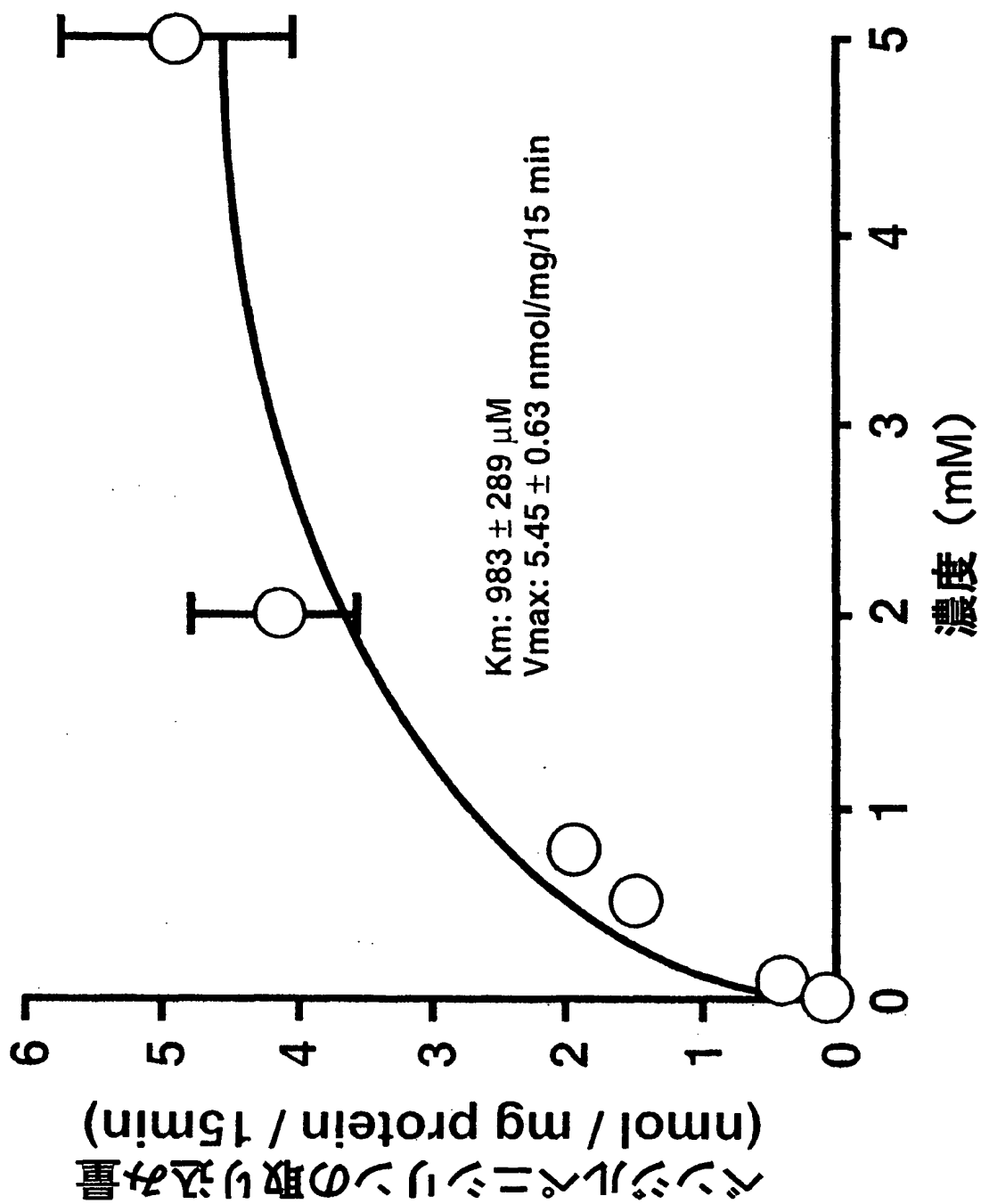


図 5

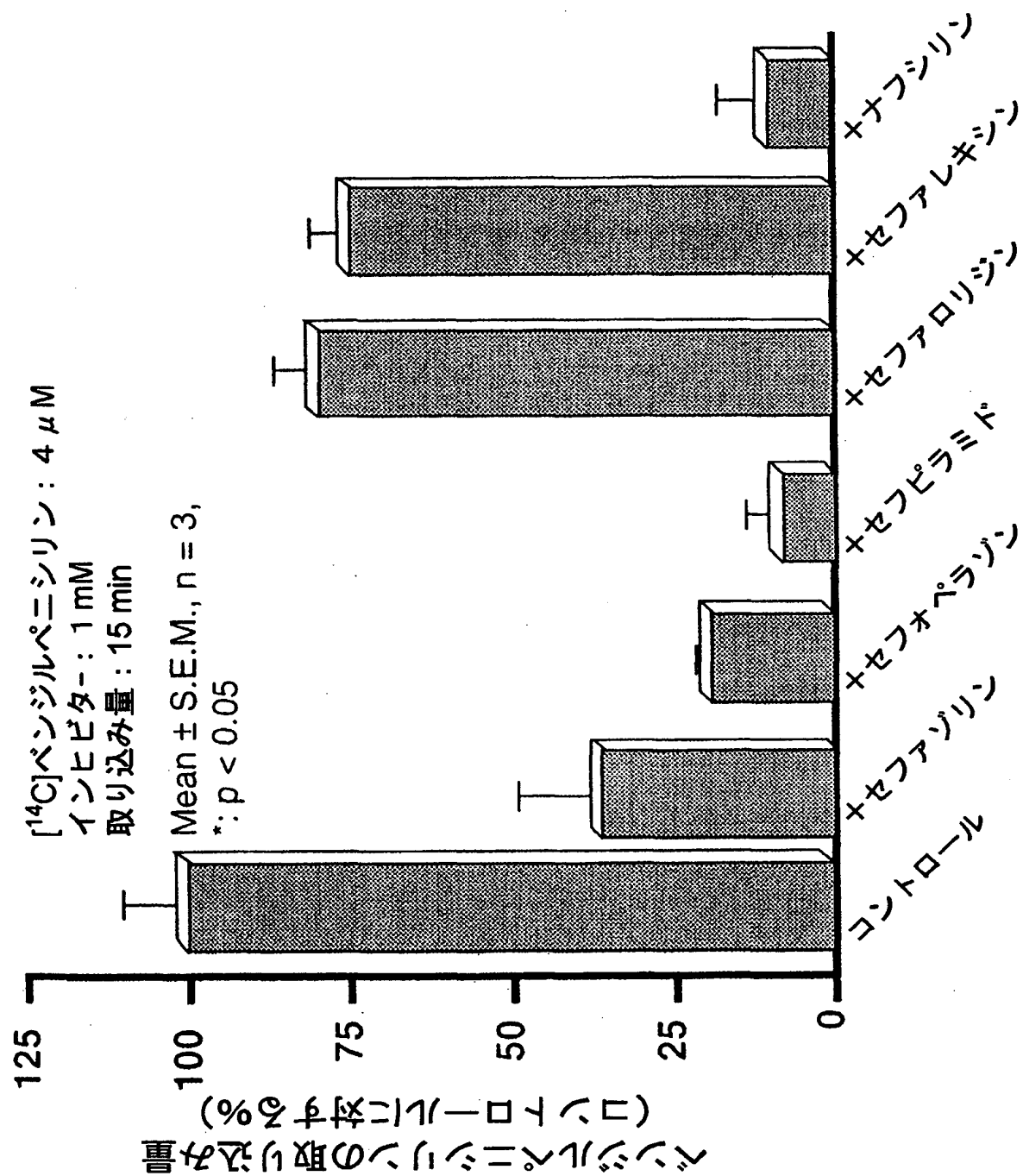
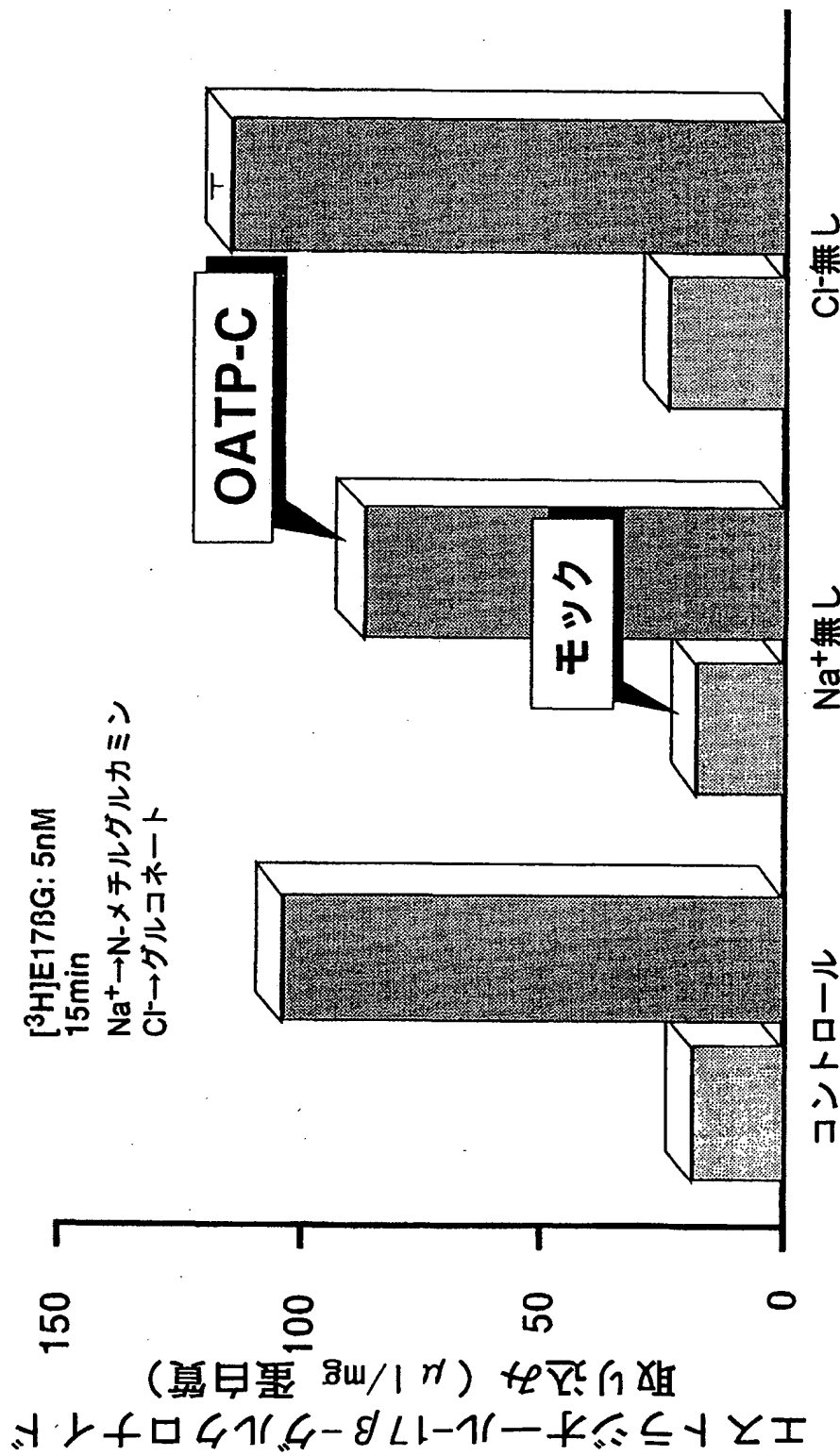


図 6



1/69

SEQUENCE LISTING

<110> CHUGAI RESEARCH INSTITUTE FOR MOLECULAR MEDICINE, INC.

<120> TRANSPORTER GENE OATP-B, C, D, AND E

<130> C2-109PCT

<140>

<141>

<150> JP 1999-267835

<151> 1999-09-21

<160> 38

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 2354

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (179)..(2305)

2/69

<400> 1

ctgtgtggcc caagaagaac tgaccccggtg tctggagctc ccaccgttat tgcacccctg 60

ctgtggctca cctgctgctg tctccaggag ccctgagaa gatttgctc ctctcccctg 120

ctaagctcca ggtcctgaga ttgaattagg ggctggagct cactgcactc cagcagtc 178

atg gga ccc agg ata ggg cca gcg ggt gag gta ccc cag gta cca gac 226

Met Gly Pro Arg Ile Gly Pro Ala Gly Glu Val Pro Gln Val Pro Asp

1

5

10

15

aag gaa acc aaa gcc aca atg ggc aca gaa aac aca cct gga ggc aaa 274

Lys Glu Thr Lys Ala Thr Met Gly Thr Glu Asn Thr Pro Gly Gly Lys

20

25

30

gcc agc cca gac cct cag gac gtg cgg cca agt gtg ttc cat aac atc 322

Ala Ser Pro Asp Pro Gln Asp Val Arg Pro Ser Val Phe His Asn Ile

35

40

45

aag ctg ttc gtt ctg tgc cac agc ctg ctg cag ctg gcg cag ctc atg 370

Lys Leu Phe Val Leu Cys His Ser Leu Leu Gln Leu Ala Gln Leu Met

50

55

60

atc tcc ggc tac cta aag agc tcc atc tcc aca gtg gag aag cgc ttc 418

Ile Ser Gly Tyr Leu Lys Ser Ser Ile Ser Thr Val Glu Lys Arg Phe

3/69

65	70	75	80
ggc ctc tcc agc cag acg tcg ggg ctg ctg gcc tcc ttc aac gag gtg 466			
Gly Leu Ser Ser Gln Thr Ser Gly Leu Leu Ala Ser Phe Asn Glu Val			
	85	90	95
ggg aac aca gcc ttg att gtg ttt gtg agc tat ttt ggc agc cgg gtg 514			
Gly Asn Thr Ala Leu Ile Val Phe Val Ser Tyr Phe Gly Ser Arg Val			
	100	105	110
cac cga ccc cga atg att ggc tat ggg gct atc ctt gtg gcc ctg gcg 562			
His Arg Pro Arg Met Ile Gly Tyr Gly Ala Ile Leu Val Ala Leu Ala			
	115	120	125
ggc ctg ctc atg act ctc ccg cac ttc atc tcg gag cca tac cgc tac 610			
Gly Leu Leu Met Thr Leu Pro His Phe Ile Ser Glu Pro Tyr Arg Tyr			
	130	135	140
gac aac acc agc cct gag gat atg cca cag gac ttc aag gct tcc ctg 658			
Asp Asn Thr Ser Pro Glu Asp Met Pro Gln Asp Phe Lys Ala Ser Leu			
145	150	155	160
tgc ctg ccc aca acc tcg gcc cca gcc tcg gcc ccc tcc aat ggc aac 706			
Cys Leu Pro Thr Thr Ser Ala Pro Ala Ser Ala Pro Ser Asn Gly Asn			
	165	170	175

4/69

tgc tca agc tac aca gaa acc cag cat ctg agt gtg gtg ggg atc atg 754

Cys Ser Ser Tyr Thr Glu Thr Gln His Leu Ser Val Val Gly Ile Met

180

185

190

ttc gtg gca cag acc ctg ctg ggc gtg ggc ggg gtg ccc att cag ccc 802

Phe Val Ala Gln Thr Leu Leu Gly Val Gly Gly Val Pro Ile Gln Pro

195

200

205

ttt ggc atc tcc tac atc gat gac ttt gcc cac aac agc aac tcg ccc 850

Phe Gly Ile Ser Tyr Ile Asp Asp Phe Ala His Asn Ser Asn Ser Pro

210

215

220

ctc tac ctc ggg atc ctg ttt gca gtg acc atg atg ggg cca ggc ctg 898

Leu Tyr Leu Gly Ile Leu Phe Ala Val Thr Met Met Gly Pro Gly Leu

225

230

235

240

gcc ttt ggg ctg ggc agc ctc atg ctg cgc ctt tat gtg gac att aac 946

Ala Phe Gly Leu Gly Ser Leu Met Leu Arg Leu Tyr Val Asp Ile Asn

245

250

255

cag atg cca gaa ggt ggt atc agc ctg acc ata aag gac ccc cga tgg 994

Gln Met Pro Glu Gly Gly Ile Ser Leu Thr Ile Lys Asp Pro Arg Trp

260

265

270

gtg ggt gcc tgg tgg ctg ggt ttc ctc atc gct gcc ggt gca gtg gcc 1042

Val Gly Ala Trp Trp Leu Gly Phe Leu Ile Ala Ala Gly Ala Val Ala

5/69

275	280	285	
ctg gct gcc atc ccc tac ttc ttc ttc ccc aag gaa atg ccc aag gaa	1090		
Leu Ala Ala Ile Pro Tyr Phe Phe Phe Pro Lys Glu Met Pro Lys Glu			
290	295	300	
aaa cgt gag ctt cag ttt cgg cga aag gtc tta gca gtc aca gac tca	1138		
Lys Arg Glu Leu Gln Phe Arg Arg Lys Val Leu Ala Val Thr Asp Ser			
305	310	315	320
cct gcc agg aag ggc aag gac tct ccc tct aag cag agc cct ggg gag	1186		
Pro Ala Arg Lys Gly Lys Asp Ser Pro Ser Lys Gln Ser Pro Gly Glu			
325	330	335	
tcc acg aag aag cag gat ggc cta gtc cag att gca cca aac ctg act	1234		
Ser Thr Lys Lys Gln Asp Gly Leu Val Gln Ile Ala Pro Asn Leu Thr			
340	345	350	
gtg atc cag ttc att aaa gtc ttc ccc agg gtg ctg ctg cag acc cta	1282		
Val Ile Gln Phe Ile Lys Val Phe Pro Arg Val Leu Leu Gln Thr Leu			
355	360	365	
cgc cac ccc atc ttc ctg ctg gtg gtc ctg tcc cag gta tgc ttg tca	1330		
Arg His Pro Ile Phe Leu Leu Val Val Leu Ser Gln Val Cys Leu Ser			
370	375	380	

6/69

tcc atg gct gcg ggc atg gcc acc ttc ctg ccc aag ttc ctg gag cgc 1378

Ser Met Ala Ala Gly Met Ala Thr Phe Leu Pro Lys Phe Leu Glu Arg

385 390 395 400

cag ttt tcc atc aca gcc tcc tac gcc aac ctg ctc atc ggc tgc ctc 1426

Gln Phe Ser Ile Thr Ala Ser Tyr Ala Asn Leu Leu Ile Gly Cys Leu

405 410 415

tcc ttc cct tcg gtc atc gtg ggc atc gtg gtg ggt ggc gtc ctg gtc 1474

Ser Phe Pro Ser Val Ile Val Gly Ile Val Val Gly Gly Val Leu Val

420 425 430

aag cgg ctc cac ctg ggc cct gtg gga tgc ggt gcc ctt tgc ctg ctg 1522

Lys Arg Leu His Leu Gly Pro Val Gly Cys Gly Ala Leu Cys Leu Leu

435 440 445

ggg atg ctg ctg tgc ctc ttc ttc agc ctg ccg ctc ttc ttt atc ggc 1570

Gly Met Leu Leu Cys Leu Phe Phe Ser Leu Pro Leu Phe Phe Ile Gly

450 455 460

tgc tcc agc cac cag att gcg ggc atc aca cac cag acc agt gcc cac 1618

Cys Ser Ser His Gln Ile Ala Gly Ile Thr His Gln Thr Ser Ala His

465 470 475 480

cct ggg ctg gag ctg tct cca agc tgc atg gag gcc tgc tcc tgc cca 1666

Pro Gly Leu Glu Leu Ser Pro Ser Cys Met Glu Ala Cys Ser Cys Pro

7/69

485

490

495

ttg gac ggc ttt aac cct gtc tgc gac ccc agc act cgt gtg gaa tac 1714

Leu Asp Gly Phe Asn Pro Val Cys Asp Pro Ser Thr Arg Val Glu Tyr

500

505

510

atc aca ccc tgc cac gca ggc tgc tca agc tgg gtg gtc cag gat gct 1762

Ile Thr Pro Cys His Ala Gly Cys Ser Ser Trp Val Val Gln Asp Ala

515

520

525

ctg gac aac agc cag gtt ttc tac acc aac tgc agc tgc gtg gtg gag 1810

Leu Asp Asn Ser Gln Val Phe Tyr Thr Asn Cys Ser Cys Val Val Glu

530

535

540

ggc aac ccc gtg ctg gca gga tcc tgc gac tca acg tgc agc cat ctg 1858

Gly Asn Pro Val Leu Ala Gly Ser Cys Asp Ser Thr Cys Ser His Leu

545

550

555

560

gtg gtg ccc ttc ctg ctc ctg gtc agc ctg ggc tcg gcc ctg gcc tgt 1906

Val Val Pro Phe Leu Leu Leu Val Ser Leu Gly Ser Ala Leu Ala Cys

565

570

575

ctc acc cac aca ccc tcc ttc atg ctc atc cta aga gga gtg aag aaa 1954

Leu Thr His Thr Pro Ser Phe Met Leu Ile Leu Arg Gly Val Lys Lys

580

585

590

8/69

gaa gac aag act ttg gct gtg ggc atc cag ttc atg ttc ctg agg att 2002

Glu Asp Lys Thr Leu Ala Val Gly Ile Gln Phe Met Phe Leu Arg Ile

595

600

605

ttg gcc tgg atg ccc agc ccc gtg atc cac ggc agc gcc atc gac acc 2050

Leu Ala Trp Met Pro Ser Pro Val Ile His Gly Ser Ala Ile Asp Thr

610

615

620

acc tgt gtg cac tgg gcc ctg agc tgt ggg cgt cga gct gtc tgt cgc 2098

Thr Cys Val His Trp Ala Leu Ser Cys Gly Arg Arg Ala Val Cys Arg

625

630

635

640

tac tac aat aat gac ctg ctc cga aac cgg ttc atc ggc ctc cag ttc 2146

Tyr Tyr Asn Asn Asp Leu Leu Arg Asn Arg Phe Ile Gly Leu Gln Phe

645

650

655

ttc ttc aaa aca ggt tct gtg atc tgc ttc gcc tta gtt ttg gct gtc 2194

Phe Phe Lys Thr Gly Ser Val Ile Cys Phe Ala Leu Val Leu Ala Val

660

665

670

ctg agg cag cag gac aaa gag gca agg acc aaa gag agc aga tcc agc 2242

Leu Arg Gln Gln Asp Lys Glu Ala Arg Thr Lys Glu Ser Arg Ser Ser

675

680

685

cct gcc gta gag cag caa ttg cta gtg tgc ggg cca ggg aag aag cca 2290

Pro Ala Val Glu Gln Gln Leu Leu Val Ser Gly Pro Gly Lys Lys Pro

9/69

690

695

700

gag gat tcc cga gtg tgagctgtct tggggcccca cctggccaag agtagcagcc 2345

Glu Asp Ser Arg Val

705

acagcagta

2354

<210> 2

<211> 709

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Met Gly Pro Arg Ile Gly Pro Ala Gly Glu Val Pro Gln Val Pro Asp

1

5

10

15

Lys Glu Thr Lys Ala Thr Met Gly Thr Glu Asn Thr Pro Gly Gly Lys

20

25

30

Ala Ser Pro Asp Pro Gln Asp Val Arg Pro Ser Val Phe His Asn Ile

35

40

45

Lys Leu Phe Val Leu Cys His Ser Leu Leu Gln Leu Ala Gln Leu Met

50

55

60

10/69

Ile Ser Gly Tyr Leu Lys Ser Ser Ile Ser Thr Val Glu Lys Arg Phe
65 70 75 80

Gly Leu Ser Ser Gln Thr Ser Gly Leu Leu Ala Ser Phe Asn Glu Val
85 90 95

Gly Asn Thr Ala Leu Ile Val Phe Val Ser Tyr Phe Gly Ser Arg Val
100 105 110

His Arg Pro Arg Met Ile Gly Tyr Gly Ala Ile Leu Val Ala Leu Ala
115 120 125

Gly Leu Leu Met Thr Leu Pro His Phe Ile Ser Glu Pro Tyr Arg Tyr
130 135 140

Asp Asn Thr Ser Pro Glu Asp Met Pro Gln Asp Phe Lys Ala Ser Leu
145 150 155 160

Cys Leu Pro Thr Thr Ser Ala Pro Ala Ser Ala Pro Ser Asn Gly Asn
165 170 175

Cys Ser Ser Tyr Thr Glu Thr Gln His Leu Ser Val Val Gly Ile Met
180 185 190

Phe Val Ala Gln Thr Leu Leu Gly Val Gly Gly Val Pro Ile Gln Pro

11/69

195

200

205

Phe Gly Ile Ser Tyr Ile Asp Asp Phe Ala His Asn Ser Asn Ser Pro

210

215

220

Leu Tyr Leu Gly Ile Leu Phe Ala Val Thr Met Met Gly Pro Gly Leu

225

230

235

240

Ala Phe Gly Leu Gly Ser Leu Met Leu Arg Leu Tyr Val Asp Ile Asn

245

250

255

Gln Met Pro Glu Gly Gly Ile Ser Leu Thr Ile Lys Asp Pro Arg Trp

260

265

270

Val Gly Ala Trp Trp Leu Gly Phe Leu Ile Ala Ala Gly Ala Val Ala

275

280

285

Leu Ala Ala Ile Pro Tyr Phe Phe Phe Pro Lys Glu Met Pro Lys Glu

290

295

300

Lys Arg Glu Leu Gln Phe Arg Arg Lys Val Leu Ala Val Thr Asp Ser

305

310

315

320

Pro Ala Arg Lys Gly Lys Asp Ser Pro Ser Lys Gln Ser Pro Gly Glu

325

330

335

12/69

Ser Thr Lys Lys Gln Asp Gly Leu Val Gln Ile Ala Pro Asn Leu Thr

340

345

350

Val Ile Gln Phe Ile Lys Val Phe Pro Arg Val Leu Leu Gln Thr Leu

355

360

365

Arg His Pro Ile Phe Leu Leu Val Val Leu Ser Gln Val Cys Leu Ser

370

375

380

Ser Met Ala Ala Gly Met Ala Thr Phe Leu Pro Lys Phe Leu Glu Arg

385

390

395

400

Gln Phe Ser Ile Thr Ala Ser Tyr Ala Asn Leu Leu Ile Gly Cys Leu

405

410

415

Ser Phe Pro Ser Val Ile Val Gly Ile Val Val Gly Gly Val Leu Val

420

425

430

Lys Arg Leu His Leu Gly Pro Val Gly Cys Gly Ala Leu Cys Leu Leu

435

440

445

Gly Met Leu Leu Cys Leu Phe Phe Ser Leu Pro Leu Phe Phe Ile Gly

450

455

460

Cys Ser Ser His Gln Ile Ala Gly Ile Thr His Gln Thr Ser Ala His

465

470

475

480

13/69

Pro Gly Leu Glu Leu Ser Pro Ser Cys Met Glu Ala Cys Ser Cys Pro

485

490

495

Leu Asp Gly Phe Asn Pro Val Cys Asp Pro Ser Thr Arg Val Glu Tyr

500

505

510

Ile Thr Pro Cys His Ala Gly Cys Ser Ser Trp Val Val Gln Asp Ala

515

520

525

Leu Asp Asn Ser Gln Val Phe Tyr Thr Asn Cys Ser Cys Val Val Glu

530

535

540

Gly Asn Pro Val Leu Ala Gly Ser Cys Asp Ser Thr Cys Ser His Leu

545

550

555

560

Val Val Pro Phe Leu Leu Leu Val Ser Leu Gly Ser Ala Leu Ala Cys

565

570

575

Leu Thr His Thr Pro Ser Phe Met Leu Ile Leu Arg Gly Val Lys Lys

580

585

590

Glu Asp Lys Thr Leu Ala Val Gly Ile Gln Phe Met Phe Leu Arg Ile

595

600

605

Leu Ala Trp Met Pro Ser Pro Val Ile His Gly Ser Ala Ile Asp Thr

14/69

610

615

620

Thr Cys Val His Trp Ala Leu Ser Cys Gly Arg Arg Ala Val Cys Arg

625

630

635

640

Tyr Tyr Asn Asn Asp Leu Leu Arg Asn Arg Phe Ile Gly Leu Gln Phe

645

650

655

Phe Phe Lys Thr Gly Ser Val Ile Cys Phe Ala Leu Val Leu Ala Val

660

665

670

Leu Arg Gln Gln Asp Lys Glu Ala Arg Thr Lys Glu Ser Arg Ser Ser

675

680

685

Pro Ala Val Glu Gln Gln Leu Leu Val Ser Gly Pro Gly Lys Lys Pro

690

695

700

Glu Asp Ser Arg Val

705

<210> 3

<211> 2452

<212> DNA

<213> Homo sapiens

15/69

<220>

<221> CDS

<222> (100)..(2172)

<400> 3

gtggacttgt tgcagttgct gtaggattct aaatccaggt gattgtttca aactgagcat 60

caacaacaaa aacatttgta tgatatctat atttcaatc atg gac caa aat caa 114

Met Asp Gln Asn Gln

1

5

cat ttg aat aaa aca gca gag gca caa cct tca gag aat aag aaa aca 162

His Leu Asn Lys Thr Ala Glu Ala Gln Pro Ser Glu Asn Lys Lys Thr

10

15

20

aga tac tgc aat gga ttg aag atg ttc ttg gca gct ctg tca ctc agc 210

Arg Tyr Cys Asn Gly Leu Lys Met Phe Leu Ala Ala Leu Ser Leu Ser

25

30

35

ttt att gct aag aca cta ggt gca att att atg aaa agt tcc atc att 258

Phe Ile Ala Lys Thr Leu Gly Ala Ile Ile Met Lys Ser Ser Ile Ile

40

45

50

cat ata gaa cgg aga ttt gag ata tcc tct tct ctt gtt ggt ttt att 306

His Ile Glu Arg Arg Phe Glu Ile Ser Ser Ser Leu Val Gly Phe Ile

55

60

65

16/69

gac gga agc ttt gaa att gga aat ttg ctt gtg att gta ttt gtg agt 354

Asp Gly Ser Phe Glu Ile Gly Asn Leu Leu Val Ile Val Phe Val Ser

70

75

80

85

tac ttt gga tcc aaa cta cat aga cca aag tta att gga atc ggt tgt 402

Tyr Phe Gly Ser Lys Leu His Arg Pro Lys Leu Ile Gly Ile Gly Cys

90

95

100

ttc att atg gga att gga ggt gtt ttg act gct ttg cca cat ttc ttc 450

Phe Ile Met Gly Ile Gly Gly Val Leu Thr Ala Leu Pro His Phe Phe

105

110

115

atg gga tat tac agg tat tct aaa gaa act aat atc aat tca tca gaa 498

Met Gly Tyr Tyr Arg Tyr Ser Lys Glu Thr Asn Ile Asn Ser Ser Glu

120

125

130

aat tca aca tcg acc tta tcc act tgt tta att aat caa att tta tca 546

Asn Ser Thr Ser Thr Leu Ser Thr Cys Leu Ile Asn Gln Ile Leu Ser

135

140

145

ctc aat aga gca tca cct gag ata gtg gga aaa ggt tgt tta aag gaa 594

Leu Asn Arg Ala Ser Pro Glu Ile Val Gly Lys Gly Cys Leu Lys Glu

150

155

160

165

tct ggg tca tac atg tgg ata tat gtg ttc atg ggt aat atg ctt cgt 642

17/69

Ser Gly Ser Tyr Met Trp Ile Tyr Val Phe Met Gly Asn Met Leu Arg

170

175

180

gga ata ggg gag act ccc ata gta cca ctg ggg ctt tct tac att gat 690

Gly Ile Gly Glu Thr Pro Ile Val Pro Leu Gly Leu Ser Tyr Ile Asp

185

190

195

gat ttc gct aaa gaa gga cat tct tct ttg tat tta ggt ata ttg aat 738

Asp Phe Ala Lys Glu Gly His Ser Ser Leu Tyr Leu Gly Ile Leu Asn

200

205

210

gca ata gca atg att ggt cca atc att ggc ttt acc ctg gga tct ctg 786

Ala Ile Ala Met Ile Gly Pro Ile Ile Gly Phe Thr Leu Gly Ser Leu

215

220

225

ttt tct aaa atg tac gtg gat att gga tat gta gat cta agc act atc 834

Phe Ser Lys Met Tyr Val Asp Ile Gly Tyr Val Asp Leu Ser Thr Ile

230

235

240

245

agg ata act cct act gat tct cga tgg gtt gga gct tgg tgg ctt aat 882

Arg Ile Thr Pro Thr Asp Ser Arg Trp Val Gly Ala Trp Trp Leu Asn

250

255

260

ttc ctt gtg tct gga cta ttc tcc att att tct tcc ata cca ttc ttt 930

Phe Leu Val Ser Gly Leu Phe Ser Ile Ile Ser Ser Ile Pro Phe Phe

265

270

275

18/69

ttc ttg ccc caa act cca aat aaa cca caa aaa gaa aga aaa gct tca 978
Phe Leu Pro Gln Thr Pro Asn Lys Pro Gln Lys Glu Arg Lys Ala Ser
280 285 290

ctg tct ttg cat gtg ctg gaa aca aat gat gaa aag gat caa aca gct 1026
Leu Ser Leu His Val Leu Glu Thr Asn Asp Glu Lys Asp Gln Thr Ala
295 300 305

aat ttg acc aat caa gga aaa aat att acc aaa aat gtg act ggt ttt 1074
Asn Leu Thr Asn Gln Gly Lys Asn Ile Thr Lys Asn Val Thr Gly Phe
310 315 320 325

ttc cag tct ttt aaa agc atc ctt act aat ccc ctg tat gtt atg ttt 1122
Phe Gln Ser Phe Lys Ser Ile Leu Thr Asn Pro Leu Tyr Val Met Phe
330 335 340

gtg ctt ttg acg ttg tta caa gta agc agc tat att ggt gct ttt act 1170
Val Leu Leu Thr Leu Leu Gln Val Ser Ser Tyr Ile Gly Ala Phe Thr
345 350 355

tat gtc ttc aaa tac gta gag caa cag tat ggt cag cct tca tct aag 1218
Tyr Val Phe Lys Tyr Val Glu Gln Gln Tyr Gly Gln Pro Ser Ser Lys
360 365 370

gct aac atc tta ttg gga gtc ata acc ata cct att ttt gca agt gga 1266

19/69

Ala Asn Ile Leu Leu Gly Val Ile Thr Ile Pro Ile Phe Ala Ser Gly

375

380

385

atg ttt tta gga gga tat atc att aaa aaa ttc aaa ctg aac acc gtt 1314

Met Phe Leu Gly Gly Tyr Ile Ile Lys Lys Phe Lys Leu Asn Thr Val

390

395

400

405

gga att gcc aaa ttc tca tgt ttt act gct gtg atg tca ttg tcc ttt 1362

Gly Ile Ala Lys Phe Ser Cys Phe Thr Ala Val Met Ser Leu Ser Phe

410

415

420

tac cta tta tat ttt ttc ata ctc tgt gaa aac aaa tca gtt gcc gga 1410

Tyr Leu Leu Tyr Phe Phe Ile Leu Cys Glu Asn Lys Ser Val Ala Gly

425

430

435

cta acc atg acc tat gat gga aat aat cca gtg aca tct cat aga gat 1458

Leu Thr Met Thr Tyr Asp Gly Asn Asn Pro Val Thr Ser His Arg Asp

440

445

450

gta cca ctt tct tat tgc aac tca gac tgc aat tgt gat gaa agt caa 1506

Val Pro Leu Ser Tyr Cys Asn Ser Asp Cys Asn Cys Asp Glu Ser Gln

455

460

465

tgg gaa cca gtc tgt gga aac aat gga ata act tac atc tca ccc tgt 1554

Trp Glu Pro Val Cys Gly Asn Asn Gly Ile Thr Tyr Ile Ser Pro Cys

470

475

480

485

20/69

cta gca ggt tgc aaa tct tca agt ggc aat aaa aag cct ata gtg ttt 1602

Leu Ala Gly Cys Lys Ser Ser Ser Gly Asn Lys Lys Pro Ile Val Phe

490

495

500

tac aac tgc agt tgt ttg gaa gta act ggt ctc cag aac aga aat tac 1650

Tyr Asn Cys Ser Cys Leu Glu Val Thr Gly Leu Gln Asn Arg Asn Tyr

505

510

515

tca gcc cat ttg ggt gaa tgc cca aga gat gat gct tgt aca agg aaa 1698

Ser Ala His Leu Gly Glu Cys Pro Arg Asp Asp Ala Cys Thr Arg Lys

520

525

530

ttt tac ttt ttt gtt gca ata caa gtc ttg aat tta ttt ttc tct gca 1746

Phe Tyr Phe Phe Val Ala Ile Gln Val Leu Asn Leu Phe Phe Ser Ala

535

540

545

ctt gga ggc acc tca cat gtc atg ctg att gtt aaa att gtt caa cct 1794

Leu Gly Gly Thr Ser His Val Met Leu Ile Val Lys Ile Val Gln Pro

550

555

560

565

gaa ttg aaa tca ctt gca ctg ggt ttc cac tca atg gtt ata cga gca 1842

Glu Leu Lys Ser Leu Ala Leu Gly Phe His Ser Met Val Ile Arg Ala

570

575

580

cta gga gga att cta gct cca ata tat ttt ggg gct ctg att gat aca 1890

21/69

Leu Gly Gly Ile Leu Ala Pro Ile Tyr Phe Gly Ala Leu Ile Asp Thr

585

590

595

acg tgt ata aag tgg tcc acc aac aac tgt ggc aca cgt ggg tca tgt 1938

Thr Cys Ile Lys Trp Ser Thr Asn Asn Cys Gly Thr Arg Gly Ser Cys

600

605

610

agg aca tat aat tcc aca tca ttt tca agg gtc tac ttg ggc ttg tct 1986

Arg Thr Tyr Asn Ser Thr Ser Phe Ser Arg Val Tyr Leu Gly Leu Ser

615

620

625

tca atg tta aga gtc tca tca ctt gtt tta tat att ata tta att tat 2034

Ser Met Leu Arg Val Ser Ser Leu Val Leu Tyr Ile Ile Leu Ile Tyr

630

635

640

645

gcc atg aag aaa aaa tat caa gag aaa gat atc aat gca tca gaa aat 2082

Ala Met Lys Lys Lys Tyr Gln Glu Lys Asp Ile Asn Ala Ser Glu Asn

650

655

660

gga agt gtc atg gat gaa gca aac tta gaa tcc tta aat aaa aat aaa 2130

Gly Ser Val Met Asp Glu Ala Asn Leu Glu Ser Leu Asn Lys Asn Lys

665

670

675

cat ttt gtc cct tct gct ggg gca gat agt gaa aca cat tgt 2172

His Phe Val Pro Ser Ala Gly Ala Asp Ser Glu Thr His Cys

680

685

690

22/69

taaggggaga aaaaaagcca cttctgcttc tgtgtttcca aacagcattg cattgattca 2232

gtaagatgtt atttttgagg agttcctggt ctttccacta agaatttcca catcttttat 2292

ggtggaagta taaataagcc tatgaactta taataaaaca aactgtaggt agaaaaaatg 2352

agagtactca ttgtacatta tagctacata tttgtggta aggttagact atatgatcca 2412

tacaaattaa agtgagagac atggttactg tgtaataaaa 2452

<210> 4

<211> 691

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 4

Met Asp Gln Asn Gln His Leu Asn Lys Thr Ala Glu Ala Gln Pro Ser

1 5 10 15

Glu Asn Lys Lys Thr Arg Tyr Cys Asn Gly Leu Lys Met Phe Leu Ala

20 25 30

Ala Leu Ser Leu Ser Phe Ile Ala Lys Thr Leu Gly Ala Ile Ile Met

35 40 45

23/69

Lys Ser Ser Ile Ile His Ile Glu Arg Arg Phe Glu Ile Ser Ser Ser

50

55

60

Leu Val Gly Phe Ile Asp Gly Ser Phe Glu Ile Gly Asn Leu Leu Val

65

70

75

80

Ile Val Phe Val Ser Tyr Phe Gly Ser Lys Leu His Arg Pro Lys Leu

85

90

95

Ile Gly Ile Gly Cys Phe Ile Met Gly Ile Gly Gly Val Leu Thr Ala

100

105

110

Leu Pro His Phe Phe Met Gly Tyr Tyr Arg Tyr Ser Lys Glu Thr Asn

115

120

125

Ile Asn Ser Ser Glu Asn Ser Thr Ser Thr Leu Ser Thr Cys Leu Ile

130

135

140

Asn Gln Ile Leu Ser Leu Asn Arg Ala Ser Pro Glu Ile Val Gly Lys

145

150

155

160

Gly Cys Leu Lys Glu Ser Gly Ser Tyr Met Trp Ile Tyr Val Phe Met

165

170

175

Gly Asn Met Leu Arg Gly Ile Gly Glu Thr Pro Ile Val Pro Leu Gly

24/69

180	185	190	
Leu Ser Tyr Ile Asp Asp Phe Ala Lys Glu Gly His Ser Ser Leu Tyr			
195	200	205	
Leu Gly Ile Leu Asn Ala Ile Ala Met Ile Gly Pro Ile Ile Gly Phe			
210	215	220	
Thr Leu Gly Ser Leu Phe Ser Lys Met Tyr Val Asp Ile Gly Tyr Val			
225	230	235	240
Asp Leu Ser Thr Ile Arg Ile Thr Pro Thr Asp Ser Arg Trp Val Gly			
245	250	255	
Ala Trp Trp Leu Asn Phe Leu Val Ser Gly Leu Phe Ser Ile Ile Ser			
260	265	270	
Ser Ile Pro Phe Phe Phe Leu Pro Gln Thr Pro Asn Lys Pro Gln Lys			
275	280	285	
Glu Arg Lys Ala Ser Leu Ser Leu His Val Leu Glu Thr Asn Asp Glu			
290	295	300	
Lys Asp Gln Thr Ala Asn Leu Thr Asn Gln Gly Lys Asn Ile Thr Lys			
305	310	315	320

25/69

Asn Val Thr Gly Phe Phe Gln Ser Phe Lys Ser Ile Leu Thr Asn Pro

325

330

335

Leu Tyr Val Met Phe Val Leu Leu Thr Leu Leu Gln Val Ser Ser Tyr

340

345

350

Ile Gly Ala Phe Thr Tyr Val Phe Lys Tyr Val Glu Gln Gln Tyr Gly

355

360

365

Gln Pro Ser Ser Lys Ala Asn Ile Leu Leu Gly Val Ile Thr Ile Pro

370

375

380

Ile Phe Ala Ser Gly Met Phe Leu Gly Gly Tyr Ile Ile Lys Lys Phe

385

390

395

400

Lys Leu Asn Thr Val Gly Ile Ala Lys Phe Ser Cys Phe Thr Ala Val

405

410

415

Met Ser Leu Ser Phe Tyr Leu Leu Tyr Phe Phe Ile Leu Cys Glu Asn

420

425

430

Lys Ser Val Ala Gly Leu Thr Met Thr Tyr Asp Gly Asn Asn Pro Val

435

440

445

Thr Ser His Arg Asp Val Pro Leu Ser Tyr Cys Asn Ser Asp Cys Asn

450

455

460

26/69

Cys Asp Glu Ser Gln Trp Glu Pro Val Cys Gly Asn Asn Gly Ile Thr
465 470 475 480

Tyr Ile Ser Pro Cys Leu Ala Gly Cys Lys Ser Ser Ser Gly Asn Lys
485 490 495

Lys Pro Ile Val Phe Tyr Asn Cys Ser Cys Leu Glu Val Thr Gly Leu
500 505 510

Gln Asn Arg Asn Tyr Ser Ala His Leu Gly Glu Cys Pro Arg Asp Asp
515 520 525

Ala Cys Thr Arg Lys Phe Tyr Phe Phe Val Ala Ile Gln Val Leu Asn
530 535 540

Leu Phe Phe Ser Ala Leu Gly Gly Thr Ser His Val Met Leu Ile Val
545 550 555 560

Lys Ile Val Gln Pro Glu Leu Lys Ser Leu Ala Leu Gly Phe His Ser
565 570 575

Met Val Ile Arg Ala Leu Gly Gly Ile Leu Ala Pro Ile Tyr Phe Gly
580 585 590

Ala Leu Ile Asp Thr Thr Cys Ile Lys Trp Ser Thr Asn Asn Cys Gly

27/69

595	600	605
Thr Arg Gly Ser Cys Arg Thr Tyr Asn Ser Thr Ser Phe Ser Arg Val		
610	615	620
Tyr Leu Gly Leu Ser Ser Met Leu Arg Val Ser Ser Leu Val Leu Tyr		
625	630	635
		640
Ile Ile Leu Ile Tyr Ala Met Lys Lys Lys Tyr Gln Glu Lys Asp Ile		
645	650	655
Asn Ala Ser Glu Asn Gly Ser Val Met Asp Glu Ala Asn Leu Glu Ser		
660	665	670
Leu Asn Lys Asn Lys His Phe Val Pro Ser Ala Gly Ala Asp Ser Glu		
675	680	685
Thr His Cys		
690		

<210> 5

<211> 2547

<212> DNA

<213> Homo sapiens

28/69

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(2130)

<400> 5

atg cag ggg aag aag ccg ggc ggt tgc tgc ggc ggc ggc cgg agc ggc 48

Met Gln Gly Lys Lys Pro Gly Gly Ser Ser Gly Gly Gly Arg Ser Gly

1

5

10

15

gag ctg cag ggg gac gag gcg cag agg aac aag aaa aag aaa aag aag 96

Glu Leu Gln Gly Asp Glu Ala Gln Arg Asn Lys Lys Lys Lys Lys Lys

20

25

30

gtg tcc tgc ttt tcc aac atc aag atc ttc ctg gtg tcc gag tgc gcc 144

Val Ser Cys Phe Ser Asn Ile Lys Ile Phe Leu Val Ser Glu Cys Ala

35

40

45

ctg atg ctg gcg cag ggc acg gtg ggc gcc tac ctg gtg agc gtc ctg 192

Leu Met Leu Ala Gln Gly Thr Val Gly Ala Tyr Leu Val Ser Val Leu

50

55

60

acc acc ctg gag cgt agg ttc aac ctg cag agc gct gac gtg ggt gtg 240

Thr Thr Leu Glu Arg Arg Phe Asn Leu Gln Ser Ala Asp Val Gly Val

65

70

75

80

atc gct agc agc ttc gag atc ggg aac ctg gcg ctc atc ctc ttc gtg 288

29/69

Ile Ala Ser Ser Phe Glu Ile Gly Asn Leu Ala Leu Ile Leu Phe Val

85

90

95

agc tac ttc ggg gca cgc ggg cac cgg ccg cgc ctg atc ggc tgc ggc 336

Ser Tyr Phe Gly Ala Arg Gly His Arg Pro Arg Leu Ile Gly Cys Gly

100

105

110

ggc atc gtc atg gcg ctg ggc gcg ctg ctg tcg gcg ctg ccc gag ttc 384

Gly Ile Val Met Ala Leu Gly Ala Leu Leu Ser Ala Leu Pro Glu Phe

115

120

125

ctg acc cac cag tac aag tac gag gcg ggc gag atc cgc tgg ggc gcc 432

Leu Thr His Gln Tyr Lys Tyr Glu Ala Gly Glu Ile Arg Trp Gly Ala

130

135

140

gag ggc cgc gac gtc tgc gca gcc aac ggc tcg ggc ggc gac gag ggg 480

Glu Gly Arg Asp Val Cys Ala Ala Asn Gly Ser Gly Gly Asp Glu Gly

145

150

155

160

ccc gac ccc gac ctc atc tgc cgc aac cgg acg gct acc aac atg atg 528

Pro Asp Pro Asp Leu Ile Cys Arg Asn Arg Thr Ala Thr Asn Met Met

165

170

175

tac ttg ctg ctc att ggg gcc cag gtg ctc ctg ggc atc ggt gct acc 576

Tyr Leu Leu Leu Ile Gly Ala Gln Val Leu Leu Gly Ile Gly Ala Thr

180

185

190

30/69

cct gtg cag ccc ctg ggc gtc tcc tac tac gac gac cac gtg cgg agg 624

Pro Val Gln Pro Leu Gly Val Ser Tyr Tyr Asp Asp His Val Arg Arg

195

200

205

aag gac tcc tcg ctc tat ata gga atc ctg ttc acg atg ctg gta ttt 672

Lys Asp Ser Ser Leu Tyr Ile Gly Ile Leu Phe Thr Met Leu Val Phe

210

215

220

gga cca gcc tgc ggg ttt atc ctg ggc tct ttc tgt acc aaa atc tac 720

Gly Pro Ala Cys Gly Phe Ile Leu Gly Ser Phe Cys Thr Lys Ile Tyr

225

230

235

240

gtg gat gcg gtc ttc att gac aca agt aac ctg gac atc act ccg gac 768

Val Asp Ala Val Phe Ile Asp Thr Ser Asn Leu Asp Ile Thr Pro Asp

245

250

255

gac ccc cgc tgg atc gga gcc tgg tgg ggt ggc ttt ctg ctc tgc ggt 816

Asp Pro Arg Trp Ile Gly Ala Trp Trp Gly Gly Phe Leu Leu Cys Gly

260

265

270

gcc tta ctc ttc ttc tct tcc ctc ttg atg ttt ggg ttt cca cag tcc 864

Ala Leu Leu Phe Phe Ser Ser Leu Leu Met Phe Gly Phe Pro Gln Ser

275

280

285

ctg ccc ccg cac tca gac ccc gcc atg gaa agc gag cag gcc atg ctc 912

31/69

Leu Pro Pro His Ser Asp Pro Ala Met Glu Ser Glu Gln Ala Met Leu

290

295

300

tcc gaa aga gaa tac gag aga ccc aag ccc agc aac ggg gtc ctg agg 960

Ser Glu Arg Glu Tyr Glu Arg Pro Lys Pro Ser Asn Gly Val Leu Arg

305

310

315

320

cac ccc ctg gag cca gac agc agt gcc tcc tgt ttc cag cag ctg aga 1008

His Pro Leu Glu Pro Asp Ser Ser Ala Ser Cys Phe Gln Gln Leu Arg

325

330

335

gtg atc ccg aag gtc acc aag cac ctg ctc tca aac cct gtg ttc acc 1056

Val Ile Pro Lys Val Thr Lys His Leu Leu Ser Asn Pro Val Phe Thr

340

345

350

tgc atc atc ctg gcc gcc tgc atg gag att gca gtg gtg gct ggc ttc 1104

Cys Ile Ile Leu Ala Ala Cys Met Glu Ile Ala Val Val Ala Gly Phe

355

360

365

gct gcc ttt ttg ggg aag tac ctg gag cag cag ttt aac ctc acc acc 1152

Ala Ala Phe Leu Gly Lys Tyr Leu Glu Gln Gln Phe Asn Leu Thr Thr

370

375

380

tct tct gcc aac cag ctg ctt ggg atg act gcg atc ccg tgt gct tgt 1200

Ser Ser Ala Asn Gln Leu Leu Gly Met Thr Ala Ile Pro Cys Ala Cys

385

390

395

400

32/69

ctg ggt atc ttc ctg gga ggt ctt ttg gtg aag aag ctc agc ctg tct 1248
 Leu Gly Ile Phe Leu Gly Gly Leu Leu Val Lys Lys Leu Ser Leu Ser
 405 410 415

gcc ctg ggg gcc att cgg atg gcc atg ctc gtc aac ctg gtg tcc act 1296
 Ala Leu Gly Ala Ile Arg Met Ala Met Leu Val Asn Leu Val Ser Thr
 420 425 430

gct tgc tac gtc tcc ttc ctc ttc ctg ggc tgc gac act ggc cct gtg 1344
 Ala Cys Tyr Val Ser Phe Leu Phe Leu Gly Cys Asp Thr Gly Pro Val
 435 440 445

gct ggg gtt act gtt ccc tat gga aac agc aca gca cct ggc tca gcc 1392
 Ala Gly Val Thr Val Pro Tyr Gly Asn Ser Thr Ala Pro Gly Ser Ala
 450 455 460

ctg gac ccc tac tcg ccc tgc aat aat aac tgt gaa tgc caa acc gat 1440
 Leu Asp Pro Tyr Ser Pro Cys Asn Asn Asn Cys Glu Cys Gln Thr Asp
 465 470 475 480

tcc ttc act cca gtg tgt ggg gca gat ggc atc acc tac ctg tct gcc 1488
 Ser Phe Thr Pro Val Cys Gly Ala Asp Gly Ile Thr Tyr Leu Ser Ala
 485 490 495

tgc ttt gct ggc tgc aac agc acg aat ctc acg ggc tgt gcg tgc ctc 1536

33/69

Cys Phe Ala Gly Cys Asn Ser Thr Asn Leu Thr Gly Cys Ala Cys Leu

500

505

510

acc acc gtc cct gct gag aac gca acc gtg gtt cct gga aaa tgc ccc 1584

Thr Thr Val Pro Ala Glu Asn Ala Thr Val Val Pro Gly Lys Cys Pro

515

520

525

agt cct ggg tgc caa gag gcc ttc ctc act ttc ctc tgt gtg atg tgt 1632

Ser Pro Gly Cys Gln Glu Ala Phe Leu Thr Phe Leu Cys Val Met Cys

530

535

540

atc tgc agc ctg atc ggt gcc atg gca cag aca ccc tca gtc atc atc 1680

Ile Cys Ser Leu Ile Gly Ala Met Ala Gln Thr Pro Ser Val Ile Ile

545

550

555

560

ctc atc agg aca gtc agc cct gaa ctc aag tct tac gct ttg gga gtt 1728

Leu Ile Arg Thr Val Ser Pro Glu Leu Lys Ser Tyr Ala Leu Gly Val

565

570

575

ctt ttt ctc ctc ctt cgt ttg ttg ggc ttc atc cct cca ccc ctc atc 1776

Leu Phe Leu Leu Leu Arg Leu Leu Gly Phe Ile Pro Pro Pro Leu Ile

580

585

590

ttc ggg gct ggc atc gac tcc acc tgc ctg ttc tgg agc acg ttc tgt 1824

Phe Gly Ala Gly Ile Asp Ser Thr Cys Leu Phe Trp Ser Thr Phe Cys

595

600

605

34/69

ggg gag caa ggc gcc tgc gtc ctc tac gac aat gtg gtc tac cga tac 1872

Gly Glu Gln Gly Ala Cys Val Leu Tyr Asp Asn Val Val Tyr Arg Tyr

610

615

620

ctg tat gtc agc atc gcc atc gcg ctc aaa tcc ttc gcc ttc atc ctg 1920

Leu Tyr Val Ser Ile Ala Ile Ala Leu Lys Ser Phe Ala Phe Ile Leu

625

630

635

640

tac acc acc acg tgg cag tgc ctg agg aaa aac tat aaa cgc tac atc 1968

Tyr Thr Thr Thr Trp Gln Cys Leu Arg Lys Asn Tyr Lys Arg Tyr Ile

645

650

655

aaa aac cac gag ggc ggg ctg agc acc agt gag ttc ttt gcc tct act 2016

Lys Asn His Glu Gly Gly Leu Ser Thr Ser Glu Phe Phe Ala Ser Thr

660

665

670

ctg acc cta gac aac ctg ggg agg gac cct gtg ccc gca aac cag aca 2064

Leu Thr Leu Asp Asn Leu Gly Arg Asp Pro Val Pro Ala Asn Gln Thr

675

680

685

cat agg aca aag ttt atc tat aac ctg gaa gac cat gag tgg tgt gaa 2112

His Arg Thr Lys Phe Ile Tyr Asn Leu Glu Asp His Glu Trp Cys Glu

690

695

700

aac atg gag tcc gtt tta tagtgactaa aggaggctg aactctgtat

2160

35/69

Asn Met Glu Ser Val Leu

705

710

tagtaatcca aggttcattt ttttcttaaa aaaagaaaaa aaggttccaa aaaaaaccaa 2220

aactcagtac acacacacag gcacagatgc acacacacgc agacagacac accgactttg 2280

tcctttttct cagcatcaga gccagacagg attcagaata aggagagaat gacatcgtgc 2340

ggcagggtcc tggaggccac tcgcgcggct gggccacaga gtctactttg aaggcacctc 2400

atggttttca ggatgctgac agctgcaagc aacaggcact gccaaattca gggaacagtg 2460

gtggccagct tggaggatgg acatttctgg atacacatac acatacaaaa cagaaaacat 2520

tttttaaaag aagtttccta aaataaa

2547

<210> 6

<211> 710

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 6

Met Gln Gly Lys Lys Pro Gly Gly Ser Ser Gly Gly Gly Arg Ser Gly

1

5

10

15

36/69

Glu Leu Gln Gly Asp Glu Ala Gln Arg Asn Lys Lys Lys Lys Lys Lys

20

25

30

Val Ser Cys Phe Ser Asn Ile Lys Ile Phe Leu Val Ser Glu Cys Ala

35

40

45

Leu Met Leu Ala Gln Gly Thr Val Gly Ala Tyr Leu Val Ser Val Leu

50

55

60

Thr Thr Leu Glu Arg Arg Phe Asn Leu Gln Ser Ala Asp Val Gly Val

65

70

75

80

Ile Ala Ser Ser Phe Glu Ile Gly Asn Leu Ala Leu Ile Leu Phe Val

85

90

95

Ser Tyr Phe Gly Ala Arg Gly His Arg Pro Arg Leu Ile Gly Cys Gly

100

105

110

Gly Ile Val Met Ala Leu Gly Ala Leu Leu Ser Ala Leu Pro Glu Phe

115

120

125

Leu Thr His Gln Tyr Lys Tyr Glu Ala Gly Glu Ile Arg Trp Gly Ala

130

135

140

Glu Gly Arg Asp Val Cys Ala Ala Asn Gly Ser Gly Gly Asp Glu Gly

37/69

145	150	155	160
Pro Asp Pro Asp Leu Ile Cys Arg Asn Arg Thr Ala Thr Asn Met Met			
	165	170	175
Tyr Leu Leu Leu Ile Gly Ala Gln Val Leu Leu Gly Ile Gly Ala Thr			
	180	185	190
Pro Val Gln Pro Leu Gly Val Ser Tyr Tyr Asp Asp His Val Arg Arg			
	195	200	205
Lys Asp Ser Ser Leu Tyr Ile Gly Ile Leu Phe Thr Met Leu Val Phe			
	210	215	220
Gly Pro Ala Cys Gly Phe Ile Leu Gly Ser Phe Cys Thr Lys Ile Tyr			
	225	230	235
Val Asp Ala Val Phe Ile Asp Thr Ser Asn Leu Asp Ile Thr Pro Asp			
	245	250	255
Asp Pro Arg Trp Ile Gly Ala Trp Trp Gly Gly Phe Leu Leu Cys Gly			
	260	265	270
Ala Leu Leu Phe Phe Ser Ser Leu Leu Met Phe Gly Phe Pro Gln Ser			
	275	280	285

38/69

Leu Pro Pro His Ser Asp Pro Ala Met Glu Ser Glu Gln Ala Met Leu

290

295

300

Ser Glu Arg Glu Tyr Glu Arg Pro Lys Pro Ser Asn Gly Val Leu Arg

305

310

315

320

His Pro Leu Glu Pro Asp Ser Ser Ala Ser Cys Phe Gln Gln Leu Arg

325

330

335

Val Ile Pro Lys Val Thr Lys His Leu Leu Ser Asn Pro Val Phe Thr

340

345

350

Cys Ile Ile Leu Ala Ala Cys Met Glu Ile Ala Val Val Ala Gly Phe

355

360

365

Ala Ala Phe Leu Gly Lys Tyr Leu Glu Gln Gln Phe Asn Leu Thr Thr

370

375

380

Ser Ser Ala Asn Gln Leu Leu Gly Met Thr Ala Ile Pro Cys Ala Cys

385

390

395

400

Leu Gly Ile Phe Leu Gly Gly Leu Leu Val Lys Lys Leu Ser Leu Ser

405

410

415

Ala Leu Gly Ala Ile Arg Met Ala Met Leu Val Asn Leu Val Ser Thr

420

425

430

39/69

Ala Cys Tyr Val Ser Phe Leu Phe Leu Gly Cys Asp Thr Gly Pro Val

435

440

445

Ala Gly Val Thr Val Pro Tyr Gly Asn Ser Thr Ala Pro Gly Ser Ala

450

455

460

Leu Asp Pro Tyr Ser Pro Cys Asn Asn Asn Cys Glu Cys Gln Thr Asp

465

470

475

480

Ser Phe Thr Pro Val Cys Gly Ala Asp Gly Ile Thr Tyr Leu Ser Ala

485

490

495

Cys Phe Ala Gly Cys Asn Ser Thr Asn Leu Thr Gly Cys Ala Cys Leu

500

505

510

Thr Thr Val Pro Ala Glu Asn Ala Thr Val Val Pro Gly Lys Cys Pro

515

520

525

Ser Pro Gly Cys Gln Glu Ala Phe Leu Thr Phe Leu Cys Val Met Cys

530

535

540

Ile Cys Ser Leu Ile Gly Ala Met Ala Gln Thr Pro Ser Val Ile Ile

545

550

555

560

Leu Ile Arg Thr Val Ser Pro Glu Leu Lys Ser Tyr Ala Leu Gly Val

40/69

565

570

575

Leu Phe Leu Leu Leu Arg Leu Leu Gly Phe Ile Pro Pro Pro Leu Ile

580

585

590

Phe Gly Ala Gly Ile Asp Ser Thr Cys Leu Phe Trp Ser Thr Phe Cys

595

600

605

Gly Glu Gln Gly Ala Cys Val Leu Tyr Asp Asn Val Val Tyr Arg Tyr

610

615

620

Leu Tyr Val Ser Ile Ala Ile Ala Leu Lys Ser Phe Ala Phe Ile Leu

625

630

635

640

Tyr Thr Thr Thr Trp Gln Cys Leu Arg Lys Asn Tyr Lys Arg Tyr Ile

645

650

655

Lys Asn His Glu Gly Gly Leu Ser Thr Ser Glu Phe Phe Ala Ser Thr

660

665

670

Leu Thr Leu Asp Asn Leu Gly Arg Asp Pro Val Pro Ala Asn Gln Thr

675

680

685

His Arg Thr Lys Phe Ile Tyr Asn Leu Glu Asp His Glu Trp Cys Glu

690

695

700

41/69

Asn Met Glu Ser Val Leu

705

710

<210> 7

<211> 2660

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (92)..(2257)

<400> 7

accagcccct cggataccac ttggccactc ccgctgaggc cactcccact gcgtggctga 60

agcctcgagg tcaccaggcg gaggcgcgga g atg ccc ctg cat cag ctg ggg 112

Met Pro Leu His Gln Leu Gly

1

5

gac aag ccg ctc acc ttc ccc agc ccc aac tca gcc atg gaa aac ggg 160

Asp Lys Pro Leu Thr Phe Pro Ser Pro Asn Ser Ala Met Glu Asn Gly

10

15

20

ctt gac cac acc cca ccc agc agg agg gca tcc ccg ggc aca ccc ctg 208

Leu Asp His Thr Pro Pro Ser Arg Arg Ala Ser Pro Gly Thr Pro Leu

42/69

25	30	35	
agc ccc ggc tcc ctc cgc tcc gct gcc cat agc ccc ctg gac acc agc			256
Ser Pro Gly Ser Leu Arg Ser Ala Ala His Ser Pro Leu Asp Thr Ser			
40	45	50	55
aag cag ccc ctc tgc cag ctc tgg gcc gag aag cat ggc gcc cgg ggg			304
Lys Gln Pro Leu Cys Gln Leu Trp Ala Glu Lys His Gly Ala Arg Gly			
	60	65	70
acc cat gag gtg cgg tac gtc tgc gcc ggg cag agc gtg gcg tgc ggc			352
Thr His Glu Val Arg Tyr Val Ser Ala Gly Gln Ser Val Ala Cys Gly			
	75	80	85
tgg tgg gcc ttc gca ccg ccg tgc ctg cag gtc ctc aac acg ccc aag			400
Trp Trp Ala Phe Ala Pro Pro Cys Leu Gln Val Leu Asn Thr Pro Lys			
	90	95	100
ggc atc ctg ttc ttc ctg tgt gcg gcc gca ttc ctg cag ggg atg act			448
Gly Ile Leu Phe Phe Leu Cys Ala Ala Ala Phe Leu Gln Gly Met Thr			
	105	110	115
gtg aat ggc ttc atc aac aca gtc atc acc tcc ctg gag cgc cgc tat			496
Val Asn Gly Phe Ile Asn Thr Val Ile Thr Ser Leu Glu Arg Arg Tyr			
	120	125	130
			135

43/69

gac ctg cac agc tac cag agc ggg ctc atc gcc agc tcc tac gac att 544

Asp Leu His Ser Tyr Gln Ser Gly Leu Ile Ala Ser Ser Tyr Asp Ile

140

145

150

gcc gcc tgc ctc tgc ctc acc ttc gtc agc tac ttc ggg ggc tca ggg 592

Ala Ala Cys Leu Cys Leu Thr Phe Val Ser Tyr Phe Gly Gly Ser Gly

155

160

165

cac aag ccg cgc tgg ctg ggc tgg ggc gtg ctg ctt atg ggc acg ggg 640

His Lys Pro Arg Trp Leu Gly Trp Gly Val Leu Leu Met Gly Thr Gly

170

175

180

tgc ctg gtg ttc gcg ctg ccc cac ttc acg gct ggc cgc tat gag gtg 688

Ser Leu Val Phe Ala Leu Pro His Phe Thr Ala Gly Arg Tyr Glu Val

185

190

195

gag ttg gac gcg ggt gtc agg acg tgc cct gcc aac ccc ggc gcg gtg 736

Glu Leu Asp Ala Gly Val Arg Thr Cys Pro Ala Asn Pro Gly Ala Val

200

205

210

215

tgt gcg gac agc acc tgc ggc ctg tcc cgc tac cag ctg gtc ttc atg 784

Cys Ala Asp Ser Thr Ser Gly Leu Ser Arg Tyr Gln Leu Val Phe Met

220

225

230

ctg ggc cag ttc ctg cat ggc gtg ggt gcc aca ccc ctc tac acg ctg 832

Leu Gly Gln Phe Leu His Gly Val Gly Ala Thr Pro Leu Tyr Thr Leu

44/69

235

240

245

ggc gtc acc tac ctg gat gag aac gtc aag tcc agc tgc tcg ccc gtc 880

Gly Val Thr Tyr Leu Asp Glu Asn Val Lys Ser Ser Cys Ser Pro Val

250

255

260

tac att gcc atc ttc tac aca gcg gcc atc ctg ggc cca gct gcc ggc 928

Tyr Ile Ala Ile Phe Tyr Thr Ala Ala Ile Leu Gly Pro Ala Ala Gly

265

270

275

tac ctg att gga ggt gcc ctg ctg aat atc tac acg gaa atg ggc cga 976

Tyr Leu Ile Gly Gly Ala Leu Leu Asn Ile Tyr Thr Glu Met Gly Arg

280

285

290

295

cgg acg gag ctg acc acc gag agc cca ctg tgg gtc ggc gcc tgg tgg 1024

Arg Thr Glu Leu Thr Thr Glu Ser Pro Leu Trp Val Gly Ala Trp Trp

300

305

310

gtc ggc ttc ctg ggc tct ggg gcc gct gct ttc ttc acc gcc gtt ccc 1072

Val Gly Phe Leu Gly Ser Gly Ala Ala Ala Phe Phe Thr Ala Val Pro

315

320

325

atc ctt ggt tac cct cgg cag ctg cca ggc tcc cag cgc tac gcg gtc 1120

Ile Leu Gly Tyr Pro Arg Gln Leu Pro Gly Ser Gln Arg Tyr Ala Val

330

335

340

45/69

atg aga gcg gcg gaa atg cac cag ttg aag gac agc agc cgt ggg gag 1168

Met Arg Ala Ala Glu Met His Gln Leu Lys Asp Ser Ser Arg Gly Glu

345

350

355

gcg agc aac ccg gac ttt ggg aaa acc atc aga gac ctg cct ctc tcc 1216

Ala Ser Asn Pro Asp Phe Gly Lys Thr Ile Arg Asp Leu Pro Leu Ser

360

365

370

375

atc tgg ctc ctg ctg aag aac ccc acg ttc atc ctg ctc tgc ctg gcc 1264

Ile Trp Leu Leu Leu Lys Asn Pro Thr Phe Ile Leu Leu Cys Leu Ala

380

385

390

ggg gcc acc gag gcc act ctc atc acc ggc atg tcc acg ttc agc ccc 1312

Gly Ala Thr Glu Ala Thr Leu Ile Thr Gly Met Ser Thr Phe Ser Pro

395

400

405

aag ttc ttg gag tcc cag ttc agc ctg agt gcc tca gaa gct gcc acc 1360

Lys Phe Leu Glu Ser Gln Phe Ser Leu Ser Ala Ser Glu Ala Ala Thr

410

415

420

ttg ttt ggg tac ctg gtg gtg cca gcg ggt ggt ggc ggc acc ttc ctg 1408

Leu Phe Gly Tyr Leu Val Val Pro Ala Gly Gly Gly Gly Thr Phe Leu

425

430

435

ggc ggc ttc ttt gtg aac aag ctc agg ctc cgg ggc tcc gcg gtc atc 1456

Gly Gly Phe Phe Val Asn Lys Leu Arg Leu Arg Gly Ser Ala Val Ile

46/69

440	445	450	455
aag ttc tgc ctg ttc tgc acc gtt gtc agc ctg ctg ggc atc ctc gtc 1504			
Lys Phe Cys Leu Phe Cys Thr Val Val Ser Leu Leu Gly Ile Leu Val			
	460	465	470
ttc tca ctg cac tgc ccc agt gtg ccc atg gcg ggc gtc aca gcc agc 1552			
Phe Ser Leu His Cys Pro Ser Val Pro Met Ala Gly Val Thr Ala Ser			
	475	480	485
tac ggc ggg agc ctc ctg ccc gaa ggc cac ctg aac cta acg gct ccc 1600			
Tyr Gly Gly Ser Leu Leu Pro Glu Gly His Leu Asn Leu Thr Ala Pro			
	490	495	500
tgc aac gct gcc tgc agc tgc cag cca gaa cac tac agc cct gtg tgc 1648			
Cys Asn Ala Ala Cys Ser Cys Gln Pro Glu His Tyr Ser Pro Val Cys			
	505	510	515
ggc tgc gac ggc ctc atg tac ttc tca ctg tgc cac gca ggg tgc cct 1696			
Gly Ser Asp Gly Leu Met Tyr Phe Ser Leu Cys His Ala Gly Cys Pro			
520	525	530	535
gca gcc acg gag acg aat gtg gac ggc cag aag gtg tac cga gac tgt 1744			
Ala Ala Thr Glu Thr Asn Val Asp Gly Gln Lys Val Tyr Arg Asp Cys			
	540	545	550

47/69

agc tgt atc cct cag aat ctt tcc tct ggt ttt ggc cat gcc act gca 1792

Ser Cys Ile Pro Gln Asn Leu Ser Ser Gly Phe Gly His Ala Thr Ala

555

560

565

ggg aaa tgc act tca act tgt cag aga aag ccc ctc ctt ctg gtt ttc 1840

Gly Lys Cys Thr Ser Thr Cys Gln Arg Lys Pro Leu Leu Leu Val Phe

570

575

580

ata ttc gtt gta att ttc ttt aca ttc ctc agc agc att cct gca cta 1888

Ile Phe Val Val Ile Phe Phe Thr Phe Leu Ser Ser Ile Pro Ala Leu

585

590

595

acg gca act cta cga tgt gtc cgt gac cct cag aga tcc ttt gcc ctg 1936

Thr Ala Thr Leu Arg Cys Val Arg Asp Pro Gln Arg Ser Phe Ala Leu

600

605

610

615

gga atc cag tgg att gta gtt aga ata cta ggg ggc atc ccg ggg ccc 1984

Gly Ile Gln Trp Ile Val Val Arg Ile Leu Gly Gly Ile Pro Gly Pro

620

625

630

atc gcc ttc ggc tgg gtg atc gac aag gcc tgt ctg ctg tgg cag gac 2032

Ile Ala Phe Gly Trp Val Ile Asp Lys Ala Cys Leu Leu Trp Gln Asp

635

640

645

cag tgt ggc cag cag ggc tcc tgc ttg gtg tac cag aat tcg gcc atg 2080

Gln Cys Gly Gln Gln Gly Ser Cys Leu Val Tyr Gln Asn Ser Ala Met

48/69

650	655	660	
agc cgc tac ata ctc atc atg ggg ctc ctg tac aag gtg ctg ggc gtc 2128			
Ser Arg Tyr Ile Leu Ile Met Gly Leu Leu Tyr Lys Val Leu Gly Val			
665	670	675	
ctc ttc ttt gcc ata gcc tgc ttc tta tac aag ccc ctg tcg gag tct 2176			
Leu Phe Phe Ala Ile Ala Cys Phe Leu Tyr Lys Pro Leu Ser Glu Ser			
680	685	690	695
tca gat ggc ctg gaa act tgt ctg ccc agc cag tcc tca gcc cct gac 2224			
Ser Asp Gly Leu Glu Thr Cys Leu Pro Ser Gln Ser Ser Ala Pro Asp			
700	705	710	
agt gcc aca gat agc cag ctc cag agc agc gtc tgaccaccgc ccgcgccac 2277			
Ser Ala Thr Asp Ser Gln Leu Gln Ser Ser Val			
715	720		
ccggccacgg cgggcactca gcatttcctg atgacagaac agtgccgttg ggtgatgcaa 2337			
tcacacggga acttctattt gacctgcaac cttctactta acctgtggtt taaagtggc 2397			
tgtgacctcc tgtccccaga gctgtacggc cctgcagtgg gtgggaggaa cttgcataaa 2457			
tatatatatta tggacacaca gtttgcacga gaacgtgttt atagaatgtg ttttataccc 2517			

49/69

gatcgtgtgt ggtgtgcgtg aggacaaact ccgcaggggc tgtgaatccc actgggaggg 2577

cggtgggcct gcagcccgag gaaggcttgt gtgtcctcag ttaaaactgt gcatatcgaa 2637

atatattttg ttatttaagc ctg 2660

<210> 8

<211> 722

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 8

Met Pro Leu His Gln Leu Gly Asp Lys Pro Leu Thr Phe Pro Ser Pro

1 5 10 15

Asn Ser Ala Met Glu Asn Gly Leu Asp His Thr Pro Pro Ser Arg Arg

20 25 30

Ala Ser Pro Gly Thr Pro Leu Ser Pro Gly Ser Leu Arg Ser Ala Ala

35 40 45

His Ser Pro Leu Asp Thr Ser Lys Gln Pro Leu Cys Gln Leu Trp Ala

50 55 60

Glu Lys His Gly Ala Arg Gly Thr His Glu Val Arg Tyr Val Ser Ala

50/69

65 70 75 80

Gly Gln Ser Val Ala Cys Gly Trp Trp Ala Phe Ala Pro Pro Cys Leu

85 90 95

Gln Val Leu Asn Thr Pro Lys Gly Ile Leu Phe Phe Leu Cys Ala Ala

100 105 110

Ala Phe Leu Gln Gly Met Thr Val Asn Gly Phe Ile Asn Thr Val Ile

115 120 125

Thr Ser Leu Glu Arg Arg Tyr Asp Leu His Ser Tyr Gln Ser Gly Leu

130 135 140

Ile Ala Ser Ser Tyr Asp Ile Ala Ala Cys Leu Cys Leu Thr Phe Val

145 150 155 160

Ser Tyr Phe Gly Gly Ser Gly His Lys Pro Arg Trp Leu Gly Trp Gly

165 170 175

Val Leu Leu Met Gly Thr Gly Ser Leu Val Phe Ala Leu Pro His Phe

180 185 190

Thr Ala Gly Arg Tyr Glu Val Glu Leu Asp Ala Gly Val Arg Thr Cys

195 200 205

51/69

Pro Ala Asn Pro Gly Ala Val Cys Ala Asp Ser Thr Ser Gly Leu Ser

210

215

220

Arg Tyr Gln Leu Val Phe Met Leu Gly Gln Phe Leu His Gly Val Gly

225

230

235

240

Ala Thr Pro Leu Tyr Thr Leu Gly Val Thr Tyr Leu Asp Glu Asn Val

245

250

255

Lys Ser Ser Cys Ser Pro Val Tyr Ile Ala Ile Phe Tyr Thr Ala Ala

260

265

270

Ile Leu Gly Pro Ala Ala Gly Tyr Leu Ile Gly Gly Ala Leu Leu Asn

275

280

285

Ile Tyr Thr Glu Met Gly Arg Arg Thr Glu Leu Thr Thr Glu Ser Pro

290

295

300

Leu Trp Val Gly Ala Trp Trp Val Gly Phe Leu Gly Ser Gly Ala Ala

305

310

315

320

Ala Phe Phe Thr Ala Val Pro Ile Leu Gly Tyr Pro Arg Gln Leu Pro

325

330

335

Gly Ser Gln Arg Tyr Ala Val Met Arg Ala Ala Glu Met His Gln Leu

340

345

350

52/69

Lys Asp Ser Ser Arg Gly Glu Ala Ser Asn Pro Asp Phe Gly Lys Thr

355

360

365

Ile Arg Asp Leu Pro Leu Ser Ile Trp Leu Leu Leu Lys Asn Pro Thr

370

375

380

Phe Ile Leu Leu Cys Leu Ala Gly Ala Thr Glu Ala Thr Leu Ile Thr

385

390

395

400

Gly Met Ser Thr Phe Ser Pro Lys Phe Leu Glu Ser Gln Phe Ser Leu

405

410

415

Ser Ala Ser Glu Ala Ala Thr Leu Phe Gly Tyr Leu Val Val Pro Ala

420

425

430

Gly Gly Gly Gly Thr Phe Leu Gly Gly Phe Phe Val Asn Lys Leu Arg

435

440

445

Leu Arg Gly Ser Ala Val Ile Lys Phe Cys Leu Phe Cys Thr Val Val

450

455

460

Ser Leu Leu Gly Ile Leu Val Phe Ser Leu His Cys Pro Ser Val Pro

465

470

475

480

Met Ala Gly Val Thr Ala Ser Tyr Gly Gly Ser Leu Leu Pro Glu Gly

53/69

485

490

495

His Leu Asn Leu Thr Ala Pro Cys Asn Ala Ala Cys Ser Cys Gln Pro

500

505

510

Glu His Tyr Ser Pro Val Cys Gly Ser Asp Gly Leu Met Tyr Phe Ser

515

520

525

Leu Cys His Ala Gly Cys Pro Ala Ala Thr Glu Thr Asn Val Asp Gly

530

535

540

Gln Lys Val Tyr Arg Asp Cys Ser Cys Ile Pro Gln Asn Leu Ser Ser

545

550

555

560

Gly Phe Gly His Ala Thr Ala Gly Lys Cys Thr Ser Thr Cys Gln Arg

565

570

575

Lys Pro Leu Leu Leu Val Phe Ile Phe Val Val Ile Phe Phe Thr Phe

580

585

590

Leu Ser Ser Ile Pro Ala Leu Thr Ala Thr Leu Arg Cys Val Arg Asp

595

600

605

Pro Gln Arg Ser Phe Ala Leu Gly Ile Gln Trp Ile Val Val Arg Ile

610

615

620

54/69

Leu Gly Gly Ile Pro Gly Pro Ile Ala Phe Gly Trp Val Ile Asp Lys

625

630

635

640

Ala Cys Leu Leu Trp Gln Asp Gln Cys Gly Gln Gln Gly Ser Cys Leu

645

650

655

Val Tyr Gln Asn Ser Ala Met Ser Arg Tyr Ile Leu Ile Met Gly Leu

660

665

670

Leu Tyr Lys Val Leu Gly Val Leu Phe Phe Ala Ile Ala Cys Phe Leu

675

680

685

Tyr Lys Pro Leu Ser Glu Ser Ser Asp Gly Leu Glu Thr Cys Leu Pro

690

695

700

Ser Gln Ser Ser Ala Pro Asp Ser Ala Thr Asp Ser Gln Leu Gln Ser

705

710

715

720

Ser Val

<210> 9

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

55/69

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially
synthesized primer sequence

<400> 9

gataagcttc tgtgtggccc aagaagaact gac

33

<210> 10

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially
synthesized primer sequence

<400> 10

gataagcttt actgctgtgg ctgctactct tgg

33

<210> 11

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

56/69

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially
synthesized primer sequence

<400> 11

aagcttcggt caataaaacc aaca

24

<210> 12

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially
synthesized primer sequence

<400> 12

cttctcttgt tggttttatt gacg

24

<210> 13

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

57/69

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially
synthesized primer sequence

<400> 13

tgtaagtat tccattgtt ccac

24

<210> 14

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially
synthesized primer sequence

<400> 14

ttggtgcttt tacttatgtc ttca

24

<210> 15

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

58/69

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially
synthesized primer sequence

<400> 15

gatggtacca aactgagcat caacaacaaa aac

33

<210> 16

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially
synthesized primer sequence

<400> 16

gatggtaccc atcgagaatc agtaggagtt atc

33

<210> 17

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

59/69

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially
synthesized primer sequence

<400> 17

gatgtacct accctgggat ctctgttttc taa

33

<210> 18

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially
synthesized primer sequence

<400> 18

gatgtaccg ttggaaaca cagaagcaga agt

33

<210> 19

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

60/69

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially
synthesized primer sequence

<400> 19

cgccctcgtg gtttttgatg tagc

24

<210> 20

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially
synthesized primer sequence

<400> 20

gcggtgcctt actcttcttc tctt

24

<210> 21

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

61/69

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially
synthesized primer sequence

<400> 21

cttttgagca agttcagcct

20

<210> 22

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially
synthesized primer sequence

<400> 22

agaggtggct tatgagtatt tctt

24

<210> 23

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

62/69

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially
synthesized primer sequence

<400> 23

tgtacaaggt gctgggcgtc ctct

24

<210> 24

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially
synthesized primer sequence

<400> 24

cgatcgggta taaaacacat tcta

24

<210> 25

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

63/69

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially
synthesized primer sequence

<400> 25

gataagcttt gcgtggctga agcctcgaag tca

33

<210> 26

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially
synthesized primer sequence

<400> 26

gatggatcca ctggtgcatt tccgccgctc tca

33

<210> 27

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

64/69

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially
synthesized primer sequence

<400> 27

gataagcttt cttcacgcc gttcccatcc ttg

33

<210> 28

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially
synthesized primer sequence

<400> 28

gatggatcca ctgttctgtc atcaggaaat gct

33

<210> 29

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

65/69

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially
synthesized primer sequence

<400> 29

aagaagaggt caagaaggaa aaat

24

<210> 30

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially
synthesized primer sequence

<400> 30

ggagcatcaa ggaacagtca ggtc

24

<210> 31

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

66/69

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially
synthesized primer sequence

<400> 31

cgtgcggcca agtgtgttcc ataa

24

<210> 32

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially
synthesized primer sequence

<400> 32

gaaggagtag ccccatagcc aatc

24

<210> 33

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

67/69

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially
synthesized primer sequence

<400> 33

tgtcattgtc cttttaccta ttat

24

<210> 34

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially
synthesized primer sequence

<400> 34

ctcaaattcct tgccttcat cctg

24

<210> 35

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

68/69

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially
synthesized primer sequence

<400> 35

agggtcagag tagaggcaaa gaac

24

<210> 36

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially
synthesized primer sequence

<400> 36

cacggcgggc actcagcatt tcct

24

<210> 37

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

69/69

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially
synthesized primer sequence

<400> 37

tgaaggtcgg agtcaacgga ttggt

26

<210> 38

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially
synthesized primer sequence

<400> 38

catgtgggcc atgaggtcca ccac

24